

**METODYKA PREPAROWANIA PRZECIWCIAŁ
FLUORESCENCYJNYCH DLA POTRZEB WIRUSOLOGII ROŚLIN**

**МЕТОДИКА ПРЕПАРИРОВАНИЯ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ АНТИТЕЛ ДЛЯ НУЖД
РАСТИТЕЛЬНОЙ ВИРУСОЛОГИИ**

**PROCEDURE ON THE PREPARATION OF FLUORESCENT ANTIBODIES
FOR PLANT VIROLOGY TESTS**

Lucyna Wajda

Laboratorium Wirusologii PAN, Kraków

Celem niniejszej pracy jest podanie praktycznych wskazówek dla przygotowania potrzebnych w metodzie immunofluorescencyjnej odczynników. Odczynniki te przygotowujemy stopniowo. Pierwszym etapem jest uzyskanie surowicy odpornościowej, następnie wyodrębnienie z niej frakcji globulinowej, której białka znakujemy barwikiem fluorescencyjnym. Surowice odpornościowe przygotowujemy z reguły na królikach, immunizując je odpowiednio oczyszczonym antygenem. W metodzie immunofluorescencyjnej ważne jest, aby surowica odpornościowa miała odpowiednio wysokie miano i w minimalnym stopniu reagowała ze zdrowym białkiem rośliny. Dlatego też lepiej jest immunizować zwierzęta dobrze oczyszczonym antygenem. Immunizację prowadzimy stopniowo, wstrzykując zwierzętom wzrastające dawki antygeny. W tydzień lub dwa po ostatnim wstrzyknięciu sprawdzamy poziom przeciwciał we krwi immunizowanego zwierzęcia. Jeżeli surowica posiada odpowiednio wysoki poziom przeciwciał, skrwawiamy uodporniane zwierzęta. Uzyskaną krew odstawiamy na dwie godziny w temp. pokojowej, a potem na kilka godzin (lub na noc) do lodówki. Następnie surowicę zlewamy znad skrzepu i sączymy przez gazę, wirujemy przez 15 min przy 1000 obr/min, rozlewamy do ampulek i przechowujemy w temperaturze -20° . Jeśli surowica ma być przechowywana dłużej, należy do niej dodać mertiolatu w stężeniu 1:10 000.

Frakcjonowanie globulin

Frakcjonowanie globulin z surowicy odpornościowej przeprowadzamy nasyconym roztworem siarczanu amonu. W 100 ml wody dest. podgrzanej do ok. 80°C rozpuszczamy 75 g siarczanu amonu. Oziębiamy i ustalamy pH na 7—7,2 przy pomocy 1 M NaOH lub kilku kropel amoniaku. Przygotowujemy również roztwór soli fizjologicznej zbuforowanej do pH 7,2 buforem fosforanowym. Na 1 litr wody dest. odważamy: 8,5 g NaCl, 1,07 g Na_2HPO_4 (bezwodny), 0,39 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$.

Frakcjonowanie przeprowadzamy w sposób następujący:

1. Odmierzoną surowicę w małej zlewce, lub próbówce wirówkowej o płaskim dnie, umieścić na mieszadle elektromagnetycznym w łaźni lodowej.

2. Uruchomić mieszadło, powoli, po kropli dodawać siarczanu amonu w ilości równej połowie wziętej do frakcjonowania surowicy. Mieszać przez 30 min.

3. Odstawić do lodówki na 3—6 godz.

4. Odwirować przy 2000—3000 obr/min przez 20 min.

5. Osad przemyć 50% roztworem siarczanu amonu w ilości równej początkowej objętości surowicy. Mieszać przez 30 min.

6. Odstawić do lodówki na 2 godz.

7. Wirować ponownie przez 20 min przy 3000 obr/min. Supernatant odrzucić.

8. Osad rozpuścić w zbuforowanym roztworze soli fizjologicznej, w ilości równej ok. 1/5 początkowej objętości surowicy.

9. Otrzymany roztwór globulin dializować przez 3—5 dni w obecności zbuforowanej soli fizjologicznej o pH 7,2 w temp. +4°C.

Roztwór soli należy zmieniać dwa razy dziennie. Dializę kończymy wtedy, kiedy w próbce dializatu nie występuje zmętnienie po dodaniu nasyconego roztworu chlorku baru (1:1, v/v). W otrzymanym roztworze globulin oznaczamy zawartość białka i w możliwie najkrótszym czasie przystępujemy do koniugowania z fluorochromem. Jeśli zajdzie konieczność przechowywania roztworu globulin przez dłuższy czas, należy je po dodaniu mer-tiolatu w stos. 1:10 000 zamrozić i przechowywać w —20°C.

Oznaczanie białek w roztworze globulin

Białka oznaczamy kolorymetrycznie, używając odczynnika biuretowego przy długości fali 540 m μ , lub posługując się odczynnikiem fenolowym Folina-Ciocalteu dokonujemy pomiarów przy długości fali 750 m μ . Białka możemy również oznaczać metodą bezpośrednią, spektrofotometrycznie przy długości fali 280 m μ . Krzywe standardowe uzyskujemy z odpowiednio rozcieńczonych roztworów gamma-globuliny o znanej zawartości białka.

Koniugowanie białek z izotiocyjanianem fluoresceiny

Przygotowujemy 0,5 M bufor dwuwęglanowy pH 9,0. W tym celu w 50 ml wody rozpuścić 3,7 g NaHCO_3 i 0,6 g Na_2CO_3 , dopełnić do 100 ml. Przechowywać w szczelnie zamkniętej flaszce.

1. W przeznaczonych do koniugowania globulinach oznaczyć białko.
2. Rozcieńczyć globuliny roztworem soli fizjologicznej o pH 7,2, tak, aby uzyskać stężenie białka 2—2,5% (20—25 mg/ml).
3. Zobojętnić roztwór globulin 0,5 M buforem dwuwęglanowym o pH 9,0, dodając go w ilości ok. 10% objętości użytych do znakowania globulin.
4. Odważyć izotiocyjanian fluoresceiny w ilości 0,05 mg barwika na 1 mg białka (stosunek 1:20), lub 0,025 mg na 1 mg białka (stosunek 1:40).
5. Zobojętnione globuliny umieścić w łaźni lodowej na mieszadle elektromagnetycznym i delikatnie mieszać, aby nie spenić roztworu.
6. Odważony barwik rozpuścić w niewielkiej ilości buforu i stopniowo wkraplać do roztworu globulin, lub też wsypać ostrożnie suchy proszek na powierzchnię mieszanego roztworu. Całość mieszać przez 12—24 godz w temp. $+4^\circ\text{C}$.

Dla pozbawienia koniugatu przeznakowanych cząsteczek, oraz niezreagowanego barwika przeprowadzamy go przez kolumnę z Sephadexu G-50, lub G-25.

Przygotowanie kolumny z Sephadexu

1. Odważyć 10 g Sephadexu i namoczyć go w wodzie dest. lub w zbuforowanym roztworze soli fizjologicznej o pH 7,2.
2. Kolumnę szklaną średnicy 2 cm i wysokości do 50 cm, posiadającą wkładkę z filtru Schott G-1, napełniamy napeczniałym Sephadexem do wysokości ok. 50 cm. Wysokość kolumny zależy od ilości koniugatu jaka będzie na niej rozdzielana. W kolumnie o wys. ok. 50 cm można z powodzeniem rozdzielać 20—30 ml koniugatu.
3. Przemyć kolumnę buforem fosforanowym pH 7,2 i ostrożnie nanieść koniugat na powierzchnię żelu. Elucję prowadzimy buforem fosforanowym 0,02 M.
4. Znakowane globuliny są wyraźnie widoczne w kolumnie w miarę przesuwania się znakowanych białek ku dołowi. Zebrane są one w pierwszym barwnym pasmie. Drugie pasmo barwne to wolny barwik, nie związany z białkiem.
5. Do probówek zbieramy kolejne niewielkie ilości eluowanego koniugatu (ok. 0,5—1 ml).
6. Kolejne frakcje z pierwszego pasma barwnego zbadać na obecność

przeciwciał i do dalszych badań bierzemy tylko te frakcje, które dają najsilniejszą reakcję precypitacji. Znakowane globuliny zwane teraz koniugatem przechowywać należy w niewielkich ilościach zliofilizowane, lub zamrożone w -20° .

Szybka metoda koniugowania białek z celitem

Odważyć 10 mg celitu, zmieszać z 1 mg barwika. Dodać 2 ml buforu dwuwęglanowego pH 8,5—9,0 i dokładnie wymieszać. Do mieszaniny celitu, barwika i buforu dwuwęglanowego, umieszczonej na łaźni lodowej dodajemy po kropli stale mieszając 2 ml roztworu globulin.

Całość mieszamy jeszcze przez 5—10 min, po czym wirujemy przez 10 min przy 3000 obr/min. Osad odrzucamy, a supernatant наносimy na kolumnę z Saphadexu G-50, lub G-25. Elucję prowadzimy 0,02 M buforem fosforanowym pH 6,5—7,0. Znakowane przeciwciała jak poprzednio znajdują się w pierwszym pasmie barwnym.

Charakterystyka koniugatu

Otrzymany koniugat charakteryzujemy według następujących parametrów: zawartość białka, zawartość fluorochromu, stosunek fluorochromu do białka, miano przeciwciał, miano barwne i sposób absorpcji proszkiem tkankowym.

Zawartość białek w koniugacie oznaczamy jedną z podanych powyżej metod. Zwykle waha się ona między 1—2 mg/ml.

Zawartość fluorochromu oznaczamy spektrofotometrycznie przy długości fali 495 m μ . Stosunek fluorochromu do białka waha się zwykle od 10×10^{-3} do 20×10^{-3} przed absorpcją proszkiem tkankowym.

Miano przeciwciał oznaczamy przy pomocy metody kropelkowej stosując wzrastające rozcieńczenia znakowanych globulin przy stałym stężeniu antygeny. Miano barwne oznaczamy barwiąc preparaty zawierające antygen kolejnymi rozcieńczeniami koniugatu: np. 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 oraz 1:32. To rozcieńczenie, w którym występuje najsilniejsza swoista fluorescencja i najslabsza fluorescencja nieswoista nazywamy mianem barwnym i z tym rozcieńczeniem pracujemy.

Absorpcja koniugatu

Starsze przepisy polecają absorbować koniugat na węglu aktywowanym. Niestety, dla badań immunofluorescencyjnych roślin metoda ta nie nadaje się, bo prowadzi do dużych strat białka, dochodzących niekiedy do ok. 40%. W wirusologii roślinnej, gdzie antygeny są słabsze, a poziom prze-

ciwciał niższy, taka utrata białek powodowałaby całkowitą nieprzydatność surowicy jako odczynnika immunofluorescencyjnego.

Wprawdzie przeprowadzenie koniugatu przez kolumnę z Sephadexu G-50 pozbawia go zupełnie wolnego barwika, to jednak koniugat musi być jeszcze dodatkowo absorbowany proszkiem tkankowym, dla osłabienia barwienia nieswoistego jakie często występuje w czasie barwienia tkanek roślinnych.

Przygotowanie roślinnego proszku tkankowego

Do dużego naczynia (ok. 2 litrowego) z suchym lodem wkładamy duży móździerz oraz kilka kawałków suchego lodu, po czym nalewamy nieco czystego acetonu.

Lejek Schotta nr 3 montujemy na pompie wodnej i również oziębiamy suchym lodem. Do tak przygotowanego móździerza wkładamy liście, z których uprzednio wycinamy główny nerw i ucieramy razem z suchym lodem i acetonem. Po rozdrobieniu tkanki roślinnej przelewamy zawartość móździerza na lejek i sączymy na pompie wodnej. Wysuszony proszek zbieramy z lejka z powrotem do móździerza i ponownie ucieramy z suchym lodem i acetonem. Czynność tę powtarzamy dotąd, dopóki na sączku nie otrzymamy drobnego, białego proszku. Przechowujemy go przez kilka dni w eksykatorze, a następnie przesypujemy do szczelnie zamkniętej flaszki.

Absorpcja koniugatu proszkiem tkankowym

Odwajamy suchy proszek w ilości 12,5 mg na 1 ml koniugatu. Proszek mieszamy z 1 ml roztworu soli fizjologicznej pH 7,2, mieszamy przez 5 min, a następnie wirujemy przez 10 min przy 3000 obr/min. Supernatant odrzucamy, a do wilgotnego proszku dodajemy 1 ml koniugatu. Całość dokładnie mieszamy i odstawiamy na 1 godz. do lodówki. Wirujemy następnie przez 5 min przy 3000 obr/min. Czynność tę powtarzamy 2 razy. Supernatant zatrzymujemy, a osad wyrzucamy. Koniugat absorbujemy zazwyczaj bezpośrednio przed użyciem go do barwienia immunofluorescencyjnego.

Przygotowanie preparatów roślinnych

Do badań immunofluorescencyjnych używamy materiału utrwalonego. Z wielu znanych utrwalaczy najlepsze wyniki uzyskujemy stosując utrwalacz Carnoya, lub jego modyfikację. Utrwalacz ten składa się: albo z 60 ml etanolu, 20 ml kwasu octowego lodowatego, albo z 60 ml etanolu, 30 ml chloroformu i 10 ml kwasu octowego lodowatego. Czas utrwalania zależy od wielkości utrwalanego materiału. Zwykle waha się od 10—30 min. Skrawki z tkanek roślinnych krajemy ręcznie, lub na mikrotomie. W tym

ostatnim przypadku posługujemy się przystawką do zamrażania preparatów, lub krajemy preparaty zatopione w żelatynie w kriostacie w temp. -20°C . Dobre rezultaty otrzymujemy krając materiał zatopiony w parafinie. Wszystkie skrawki z wyjątkiem parafinowych przyklepamy na szkiełkach przedmiotowych lepikiem sporządzonym z 10 g żelatyny, 60 cm^3 wody, 50 cm^3 gliceryny i 1 g fenolu. Preparaty dokładnie płuczemy z utrwalacza, odwadniamy w szeregu alkoholi, po 5 min w każdym, a następnie przenosimy do buforu fosforanowego pH 7,2 na 1—12 godz. Bufor należy zmieniać kilka razy.

Barwienie immunofluorescencyjne

Preparaty starannie przemyte buforem fosforanowym pokrywamy dokładnie koniugatem i umieszczamy w wilgotnej komorze na okres od 0,5—1 godz. w temp. pokojowej. Następnie koniugat zlewamy z preparatu i przemywamy go kilka razy roztworem soli fizjologicznej o pH 7,2. Preparaty zamykamy w zbuforowanej glicerynie (9 części gliceryny i 1 część buforu fosforanowego). Preparaty oglądamy w mikroskopie fluorescencyjnym, lub w zwykłym mikroskopie stosując przystawkę z lampą HBO-50, lub lepiej HBO-200. Przy przeglądaniu preparatów używamy filtrów UG-1 i GG-9. Równocześnie z barwieniem immunofluorescencyjnym przeprowadzamy na tym samym materiale barwienie kontrolne, w celu sprawdzenia specyficzności reakcji immunofluorescencyjnych. Kontrola specyficzności polega na przeprowadzeniu reakcji blokowania antygenu, przeciwciał, absorpcji przeciwciał lub denaturacji antygenu. Jak wynika z dotychczasowych prac z wirusami roślinnymi, najlepsze wyniki daje metoda barwienia pośredniego. Zaletą tej metody jest przede wszystkim to, że wymaga tylko jednego uniwersalnego odczynnika znakowanego, a mianowicie koziej antyglobulinowej surowicy króliczej, przy czym surowica królicza używana jako warstwa pośrednia nie musi mieć wysokiego miana przeciwciał, która to właściwość jest szczególnie cenna w pracy z wirusami roślinnymi. Poza tym metoda pośrednia jest znacznie czulsza i wykrywa mniej więcej 10 razy mniejsze ilości antygenu. W metodzie immunofluorescencyjnej pozytywne rezultaty zależą nie tylko od starannego przygotowania poszczególnych odczynników i preparatów, ale i od dużej wprawy w ocenie i interpretacji samych preparatów.

LITERATURA

- Albrecht P. — 1963, Vizualizácia antigénov metódou fluorescentnych protilatok. Nákl. Stat. zdr. nakl.
- Cherry W. B., Goldman M., Carski T. R., Moody M. D. — 1960, Fluorescent Antibody Techniques. U. S. Govt. Print. Office, Washington.

- Dunin M. S., Wołodarskij A. D. — 1964, Ljuminiscentnoserologiczeskij mietod diagnostiki vozбудitielej virusnych i baktierialnych bolezniej rastenij. Izwiestia T.S.C.H.
- Lipp W. J. — 1961, *Histol. Cytoch.* 9: 458—549.
- Nagaraj A. N. — 1962, *Virology*, 18: 329—332.
- Nairn R. C. — 1962, *Fluorescent protein tracing*. Livingstone Ltd, Edinburg.
- Pozdena J., Wajda L., Jermoljev E. — 1967, w druku.
- Rauch S. — 1964, *Immunohistochemie*, Thieme, Stuttgart.
- Rindenknecht H. — 1960, *Experientia (Basel)*, 16: 430—431.
- Rindenknecht H. — 1962, *Nature*, 193: 167—168.
- Schramm G., Röttger B. — 1959, *Ztschr. f. Naturforschung*, 14b: 510—515.
- Stefanac Z., Pende B., Milicic D. — 1967, *Biol. Plant.* 9: 109—115.
- Wajda L., Pozdena J., Jermoljev E. — 1967, *Acta Biol. Cracov.*, X/2.

РЕЗЮМЕ

В работе изложены в большом сокращении основы препаратики флуоресцентных антител. Представлено механизм процесса конъюгации белка с изотиоцианатом флуоресцеина и методы очистки конъюгатов, а также способы приготовления растительных препаратов для иммунофлуоресцентных исследований.

SUMMARY

The paper presents general principles of the preparation of fluorescent antibodies for plant virus diseases. The conjugation process of proteins with isothiocyanate-fluoresceine, the purification of conjugates as well as the method of preparation of plant material for immunofluorescent studies are described.

STRESZCZENIE

W pracy omówiono w dużym skrócie podstawy preparatyki przeciwciał fluorescencyjnych. Omówiono również przebieg procesu koniugacji białek z izotiocyjanianem fluoresceiny, oraz metody oczyszczania koniugatów, jak też i sposoby przygotowywania preparatów roślinnych do badań immunofluorescencyjnych.