

# WYBRANE METODY OTRZYMYWANIA PRZECIWCIAŁ DO WYKRYWANIA I IDENTYFIKACJI PATOGENÓW ZIEMNIAKA

mgr inż. Wioleta Stochła, dr inż. Włodzimierz Przewodowski  
IHAR – PIB, Pracownia Diagnostyki Molekularnej i Biochemii w Boninie  
e-mail: wlodzimierz.przewodowski@tu.koszalin.pl

## Streszczenie

Obecnie wiele technik diagnostycznych do identyfikacji patogenów ziemniaka bazuje na wykorzystaniu przeciwciał. Jakość i specyficzność tych technik zależy w głównej mierze od sposobu izolacji i jakości stosowanych przeciwciał. W celu uzyskania przeciwciał o wysokim mianie i specyficzności stosuje się różne techniki oczyszczania. Dla polepszenia jakości przeciwciał, oprócz wielu standardowych technik do ich izolacji, coraz częściej stosuje się różne modyfikacje. Na uwagę zasługują innowacyjne działania prowadzone w tym kierunku przez zespół naukowców Pracowni Diagnostyki Molekularnej i Biochemii ZNiOZ w Boninie.

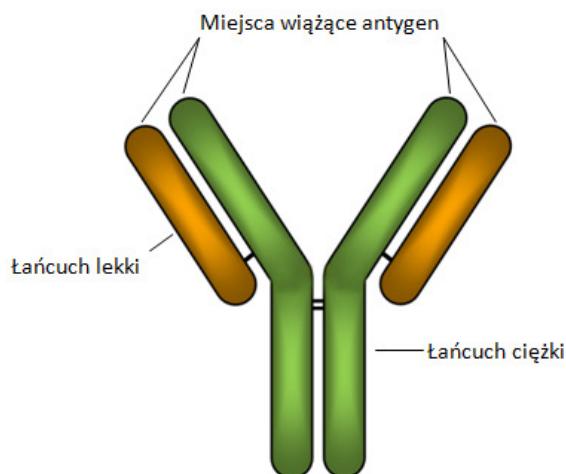
**Słowa kluczowe:** chromatografia powinowactwa, patogeny ziemniaka, przeciwciała, techniki oczyszczania przeciwciał, testy immunologiczne

**P**raca ma na celu zaprezentowanie kilku nowych metod oczyszczania przeciwciał wykorzystywanych w wykrywaniu i identyfikacji różnych patogenów ziemniaka. Ziemniak, jako jedna z ważniejszych gospodarczo roślin na świecie, jest atakowany przez liczne patogeny. Wśród wielu stosowanych obecnie metod do ich wykrywania i identyfikacji znaczną grupę stanowią metody immunologiczne (serologiczne), oparte na wykorzystaniu cząstek receptorowych – immunoglobulin, nazywanych powszechnie przeciwciałami (Przewodowski 2009). Do takich technik można zaliczyć m.in. test immunoenzymatyczny ELISA do wykrywania wirusów i bakterii (Drennan i in. 1993; De Boer i in. 1994, 2005), test pośredniej immunofluorescencji – IF (Slack i in. 1979; De Boer, Copeman 1980), FISH czy też opracowane i opatentowane przez zespół naukowców z Pracowni Diagnostyki Molekularnej i Biochemii IHAR – PIB w Boninie nowoczesne testy, jak paskowy typu Lateral-Flow oraz filtracyjny typu Flow-Through do szybkiej i specyficznej identyfi-

kacji czystych szczepów bakterii *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Cms) powodujących bakteriozę pierścieniową ziemniaka (Przewodowski, Barnyk 2009).

Przeciwciała są to białka surowicy o masie cząsteczkowej od 140 do 970 kD. W przyrodzie w organizmach żywych główną funkcją przeciwciał jest unieszkodliwianie obcych cząsteczek – immunogenów (antygenów), takich jak obce białka, kwasy nukleinowe, wirusy czy bakterie, które wnikają do organizmu. Właściwość powstawania przeciwciał w organizmie zwierząt pod wpływem określonego antygenu oprócz zastosowań medycznych zyskała również ogromne znaczenie w szeroko pojętej diagnostyce. Dzięki procesowi immunizacji, wskutek celowego wprowadzenia do organizmu zwierzęcia określonego antygenu (osłabionych – atenuowanych lub zabitych bakterii czy wirusów zasiedlających tkankę ziemniaka), uzyskuje się w krwi zwierzęcia przeciwciała, które po wyizolowaniu służą do wykrywania tych samych bakterii czy wirusów w testach diagnostycznych.

Rozróżniamy różne rodzaje przeciwciał, jak IgG, IgM, IgA, IgD, IgE, z których najpowszechniej wykorzystywane w diagnostyce są immunoglobuliny G (IgG) pokazane schematycznie na rysunku 1. Składają się one z dwóch łańcuchów ciężkich i dwóch łańcuchów lekkich, które są połączone mostkami dwusiarczkowymi.



Rys. 1. Przykładowy schemat budowy immunoglobuliny G (IgG)  
(Źródło własne PDMiB, ZNiOZ w Boninie)

Ze względu na liczbę epitopów, czyli miejsc na powierzchni antygeny, które mogą być rozpoznawane przez przeciwciała (miejsca przeciwciał wiążące antygen), rozróżniamy przeciwciała mono- i poliklonalne. Monoklonalne są wytwarzane przez jeden klon komórek i skierowane przeciwko ściśle określonej antygenowi. Ich przeciwciałem są przeciwciała poliklonalne, czyli takie, które pochodzą z więcej niż jednego klonu komórek plazmatycznych i wiążą różne epitopy, a równocześnie wykazują powinowactwo tego samego antygeny. Przeciwciała poliklonalne są zazwyczaj mniej specyficzne, ale bardziej czułe, natomiast monoklonalne charakteryzują się wysoką specyficznością i niższą czułością (Brzozowski 2007). Przeciwciała poliklonalne można otrzymać poprzez ich izolację z krwi zwierzęcia immunizowanego antygenem i są one łatwiejsze i tańsze do otrzymania niż monoklonalne.

Aby skutecznie wykrywać określony antygen, przeciwciała muszą być wobec niego wysoce specyficzne, czyli muszą go bardzo dobrze rozpoznawać. Tę cechę przeciwciał wykorzystuje się do wykrywania i identyfikacji bakterii w testach diagnostycznych. Bar-

dzo ważnym parametrem skutecznych testów diagnostycznych, pozwalających wykrywać z wysoką czułością i specyficznością różne patogeny bakteryjne i wirusowe ziemniaka, są odpowiedniej jakości przeciwciała. Jakość przeciwciał zależy nie tylko od ich koncentracji, ale głównie od ich miana, czyli liczby IgG specyficznych na dany antygen w stosunku do liczby innych przeciwciał w surowicy. Jednym z czynników wpływających w znacznym stopniu na jakość przeciwciał jest sposób ich izolacji z surowicy.

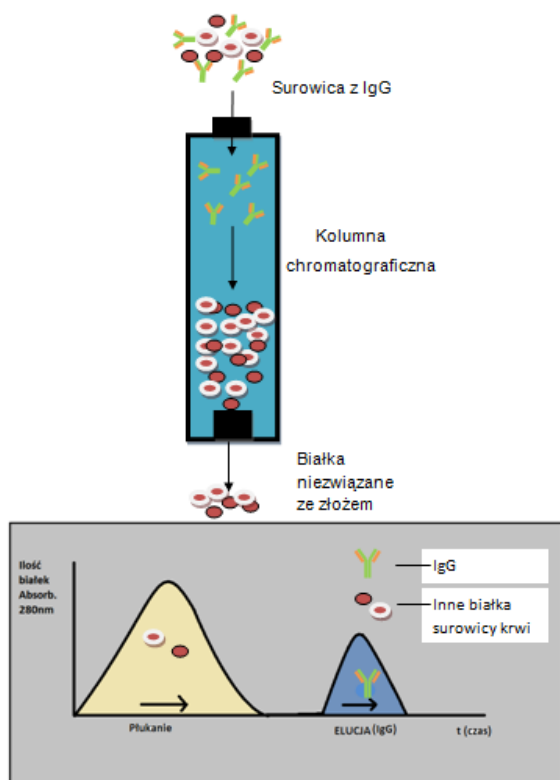
Istnieje wiele sposobów wyodrębniania przeciwciał z surowicy. Przeciwciała skierowane przeciwko wirusom czy bakteriom występującym w ziemniaku są oczyszczane m.in. przez wytrącanie siarczanem amonu, strącanie glikolem polietylenowym, metodą chromatografii jonowymiennej, przez filtrację na żelu (zawierającym np. usieciowany dextran, agarozę lub usieciowaną agarozę) lub na drodze chromatografii powinowactwa z białkiem A itp. Metody te różnią się pomiędzy sobą m. in. efektywnością, czystością uzyskanych przeciwciał, czasem oczyszczania oraz kosztem.

Jednym z najprostszych sposobów oczyszczania przeciwciał jest strącanie za pomocą siarczanu amonu. Jest to proces wytrącania białek z roztworów poprzez dodanie stężonego, najczęściej 50-proc. roztworu soli – tzw. wysalanie białek (Kłyszewko-Stefanowicz 2005). Przeciwciała wytrącane siarczanem amonu nie ulegają denaturacji, więc po obniżeniu stężenia soli (np. przez dializę) otrzymuje się roztwór przeciwciał o pełnej aktywności biologicznej. Minusem tej metody jest otrzymywanie przeciwciał zanieczyszczonych innymi białkami o podobnych właściwościach.

W celu uzyskania przeciwciał o wyższej czystości stosuje się inne metody, np. chromatografię powinowactwa (rys. 2). Jest ona szczególnym typem chromatografii adsorpcyjnej, w której wykorzystuje się wzajemne oddziaływanie dwóch substancji na zasadzie łączenia ze sobą za pomocą odpowiadających sobie wiązań. Technika ta pozwala na znaczne uproszczenie procedur izolowania wybranych przeciwciał, przy jednoczesnym zachowaniu ich aktywności biologicznej. Przeciwciała są unieruchamiane (przyłączane) na stałym podłożu, takim jak np. żel aga-

rozowy (Sefaroza), żele dekstranowe (Sephadex) lub żele poliakrylamidowe. Podłoże jest aktywowane chemicznie i po zawieszeniu w buforze fosforanowym umieszczane w specjalnych kolumnach chromatograficznych. Procedura oczyszczania przeciwciał metodą chromatografii powinowactwa obejmuje kolejne następujące po sobie etapy, takie jak: aktywacja złoża, przyłączenie przeciwciał do złoża, płukanie (usuwanie) niezwiązanych przeciwciał i innych białek oraz elucja – odmycie związanych z żelem specyficznych przeciwciał (Wąlkowski 2000).

Innym rodzajem wykorzystania chromatografii powinowactwa jest modyfikacja opisanej metody polegająca na wiązaniu do złoża, unieruchomionego w kolumnie wypełnionej np. dodatnio naładowaną dietyloaminoetylocelulozą (DEAE-celulozą), białek innych niż oczyszczane przeciwciała, podczas gdy przeciwciała – dzięki zastosowaniu odpowiedniego buforu – opuszczają kolumnę chromatograficzną.



Rys. 2. Schemat systemu do oczyszczania przeciwciał metodą chromatografii powinowactwa (Źródło własne PDMiB, ZNiOZ w Boninie)

Jednym z nielicznych ośrodków w Polsce i na świecie prowadzącym zaawansowane prace nad nowoczesnymi technikami oczyszczania i udoskonalania metod izolacji IgG

oraz technik diagnostycznych do identyfikacji patogenów ziemniaka jest Zakład Nasiennictwa i Ochrony Ziemniaka (ZNiOZ) w Boninie. Realizowane przez zespół Pracowni Diagnostyki Molekularnej i Biochemii (PDMiB) prace skupiają się na udoskonalaniu metod izolacji i oczyszczania przeciwciał skierowanych przeciwko patogenom ziemniaka takim jak wirusy i bakterie zasiedlające tkanki roślin i bulw. W celu uzyskania bardziej efektywnych sposobów oczyszczania przeciwciał stosowane są różne ulepszenia, polegające na zastosowaniu technik chromatograficznych i membranowych. Przykładowo łączy się różne metody izolacji, jak wstępne oczyszczanie przez strącanie siarczanem amonu, a następnie oczyszczanie na złożu chromatograficznym.

Jednym ze stosowanych obecnie sposobów oczyszczania IgG jest chromatografia tiofilna – jako często tańsza i bardziej wydajna od wielu innych metod (Barnyk i in. 2008). W tego typu chromatografii wykorzystuje się złożo z wiązaniami o strukturze tioetylosulfonowej, która wykazuje powinowactwo do grup sulfhydrylowych (siarkowych) występujących w białkach typu IgG. Z uwagi na dużą liczbę grup siarkowych we frakcji białek surowicy, jaką stanowią immunoglobuliny G, chromatografia tiofilna nadaje się szczególnie do oczyszczania tego typu białek. Dodatkowym atutem metody jest efektywne wiązanie się białka do złoża przy wysokim stężeniu soli oraz uwalnianie białka z kolumny przy malejącej sile jonowej. W konsekwencji tego pozbawione nadmiaru soli eluowane białko może stanowić dobry materiał do dalszych badań.

Obecnie przewagę liczebną w oczyszczaniu przeciwciał mają pojedyncze metody z zastosowaniem filtracji żelowej oraz tradycyjnej chromatografii jonowymiennej. Coraz częściej jednak dla uzyskania przeciwciał lepszej jakości (czystości) i o wysokim mianie w miejsce pojedynczych metod stosuje się połączenie kilku różnych sposobów izolacji. W PDMiB w Boninie takim sposobem oczyszcza się przeciwciała skierowane przeciwko patogenom wirusowym oraz bakteryjnym ziemniaka, jak *C. michiganensis* ssp. *sepedonicus*.

Jednym z opracowanych w Pracowni w Boninie testów bazujących na wykorzystaniu IgG oczyszczanych tą metodą jest filtracyjny test do szybkiej i specyficznej identyfikacji czystych szczepów bakterii Cms. Opracowany test bazuje na wykorzystaniu złota koloidalnego, którego nanocząsteczki pokrywano przeciwciałami IgG anty-Cms. Jego zasada polega na specyficznym barwieniu znajdujących się w roztworze komórek bakterii Cms za pomocą koniugatu złota koloidalnego z poliklonalnymi przeciwciałami króliczymi skierowanymi na bakterie Cms (Przewodowski, Barnyk 2009). Nanocząsteczki złota koloidalnego skoniugowane z przeciwciałami rozpoznają na zasadzie immunopowinowactwa komórki bakteryjne, tworząc na ich powierzchni barwną otoczkę. Opracowany test w porównaniu z konwencjonalną metodą DAS – ELISA okazał się znacznie szybszy i prostszy w wykonaniu, zachowując jednocześnie analogiczną czułość jak test ELISA (Przewodowski, Barnyk 2009).

#### Literatura

**1. Barnyk A., Lewosz J., Treder K., Przewodowski W., Pilecki T. 2008.** Zastosowanie chromatografii tiofilnej do izolacji przeciwciał poliklonalnych z surowicy krwi królików. – Biul. IHAR 248: 87-95; **2. Brzozowski S. 2007.** Reakcje krzyżowe przeciwciał poliklonal-

nych w teście immunofluorescencji pośredniej (IFAS) stosowanym do wykrywania *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. – Biul. IHAR 244: 215-222; **3. De Boer S. H., Copeman R. J. 1980.** Bacterial ring rot testing with the indirect fluorescent antibody staining procedure. – Am. Potato J. 57: 457-465; **4. De Boer S. H., Charkowski A. O., Zink R. T., Martínez-Soriano J. P., Flores-Olivas A. 2005.** Procedure for detection and identification of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Spieckermann and Kotthoff) Davis, Gilaspie, Vidaver and Harris, in potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers. – Rev. Mexicana de Fitopatología 23: 329-334 **5. Kłyszewko-Stefanowicz L. 2005.** Ćwiczenia z biochemii. PWN Warszawa; **6. Przewodowski W., Barnyk A. 2010.** Diagnostyczne metody do wykrywania fitopatogennej bakterii ziemniaka. – Ziemn. Pol. 1: 33-36; **7. Przewodowski W., Barnyk A. 2009.** Szybki test do identyfikacji bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*. – Prog. Plant Prot. 49(2): 696-700; **8. Przewodowski W. 2009.** Nowoczesne metody w diagnostyce bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*. – Prog. Plant Prot. 49(3): 1335-1343; **9. Slack S. A., Sanford H. A., Manzer F. E. 1979.** The latex agglutination test as rapid serological assay for *Corynebacterium sepedonicum*. – Am. Potato J. 56: 441-446. **10. Walkowiak B. 2000.** Techniki chromatografii cieczowej. Przykłady zastosowań. Wyd. MORPOL Lublin

W. Stochła, W. Przewodowski – Ziemn. Pol. 2014 nr 3, s. 46-49

## Ziemniaki duszone z kapustą i kielbasą po szwajcarsku

1 kg ziemniaków, 50 dag białej kapusty, 2 cebule, 2 łyżki smalcu lub 2 łyżki pokrajanej w drobną kostkę słoniny, 2 szklanki rosółu lub wywaru z warzyw, 15 dag kielbasy (zwyczajna, parówkowa), sól, pieprz lub ostra papryka

Cebulę pokroić w piórka, posolić podgrzać chwilę, dodać smalec i poddusić, nie rumieniąc. (Jeśli dodajemy słoninę, trzeba ją najpierw stopić i dopiero dodać cebulę).

Kapustę umyć, drobno poszatkować, połączyć z cebulą, osolić i dusić ok. 15 min, po czym zalać gorącym rosółem lub wywarem z warzyw.

Obrane i opłukane ziemniaki pokroić na części, dodać do kapusty, posolić, oprószyć ostrą papryką lub pieprzem. Dusić w rondlu

ustawionym na płytce, na małym ogniu.

Pod koniec włożyć obraną ze skórki kielbasę, a gdy się zagrzeje, wyjąć i pokroić w plasterki.

Uduszoną potrawę wyłożyć na półmisek i obłożyć plasterkami kielbasy. Podawać na obiad lub kolację z surówką z pomidorów.

Z. Zawistowska. Ziemniaki. Watra Warszawa 1983