



Technologia Luminex xMAP[®] – nowe narzędzie w diagnostyce chorób roślin

Wojciech Śledź, Emilia Łoś, Ewa Łojkowska

Zakład Ochrony i Biotechnologii Roślin, Katedra Biotechnologii,
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii, Uniwersytet Gdański
i Gdański Uniwersytet Medyczny, Gdańsk

Technology Luminex xMAP[®] – a new tool in the diagnostics of plant diseases

Summary:

The presented paper reviews the aspects of Luminex xMAP[®] technology as a new tool in diagnostics of plant diseases. Luminex xMAP[®] technology, based on flow cytometry, employs tiny colored beads (microspheres) combined with specific analytes and ligands (antibodies, oligonucleotides ect.). Initially, this system was known as FlowMetrix. The Luminex xMAP[®] technology is mainly employed in medical diagnostics. This technology is suited to very wide range of medical applications: allergy testing, cancer markers, gene expression, genotyping, tissue typing and many others.

Luminex xMAP[®] technology was applied in the diagnostics of plant diseases. The first attempts were directed towards the fungal and bacterial plant pathogens. Nowadays, this technology has been applied to detection of bacteria such as: *Pectobacterium carotovorum* or *Dickeya dianthicola* and viral pathogens such as: Potato Virus X, Potato Virus Y and Potato Leafroll Virus. The Luminex xMAP[®] technology offers simultaneous detection of several factors (pathogens) in one test.

Key words:

detection, Luminex xMAP technology, plant pathogens.

Adres do korespondencji

Wojciech Śledź,
Katedra Biotechnologii,
Międzyuczelniany Wydział
Biotechnologii,
ul. Kładki 24,
Gdańsk 80-822;
e-mail:
sledz@biotech.ug.gda.pl

biotechnologia

1 (88) 97–108 2010

1. Wstęp

Kontrola patogenów roślin jest często bardzo utrudniona, ponieważ nie zawsze dysponujemy efektywnymi narzędziami diagnostycznymi pozwalającymi na wykrywanie i identyfikację

patogenów lub środkami chemicznymi do ich efektywnego zwalczania. Długoletnie doświadczenie pozwala inspektorom ochrony roślin w identyfikacji niektórych bakteryjnych, wirusowych czy grzybowych patogenów na podstawie widocznych objawów chorobowych. Jednak precyzyjna diagnostyka czynnika chorobotwórczego wymaga często zastosowania specjalistycznych metod badawczych, np. testu ELISA (ang. *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), czy metody IF (ang. *Immunofluorescent Method*) (1). Rozwój nowych technologii oraz metod (dzięki ich coraz wyższej czułości), umożliwia niejednokrotnie wykrycie czynnika sprawczego jeszcze przed pojawieniem się symptomów chorobowych na etapie tzw. infekcji latentnej. Daje także możliwość identyfikacji mikroorganizmów nie namnażających się w warunkach laboratoryjnych (VBNC, ang. *Viable but non Culturable*).

Szybka i skuteczna identyfikacja czynnika chorobotwórczego pozwala na podjęcie działań mających na celu ograniczenie rozprzestrzeniania się choroby, np. poprzez zastosowanie wolnego od patogenów materiału roślinnego przeznaczonego do rozmnażania, eliminację roślin porażonych lub zastosowanie dostępnych środków ochrony roślin. Szczególnie ważne jest szybkie wykrywanie i identyfikacja patogenów podlegających przymusowemu zwalczaniu (tzw. kwarantannowych).

Nowe możliwości w dziedzinie wykrywania i identyfikacji wirusowych, bakteryjnych i grzybowych patogenów roślin niesie ze sobą technologia Luminex xMAP[®] wykorzystująca mikrokulki opłaszczone m.in. przeciwciałami pierwszorzędowymi oraz przeciwciałami drugorzędowymi znakowanymi fluorescencyjnie. Choć technologia ta znana jest już od dziesięciu lat, to jak dotychczas miała zastosowanie głównie w badaniach medycznych.

Dopiero niedawno podjęto próby wykorzystania technologii Luminex xMAP[®] w celu szybkiego wykrywania i identyfikacji patogenów roślin uprawnych. Technologia ta daje możliwość jednoczesnego wykrywania od kilku do kilkunastu patogenów w pojedynczej próbce zainfekowanego materiału roślinnego, gleby lub wody w stosunkowo krótkim czasie, co czyni ją metodą alternatywną do mikromacierzy (ang. *microchips*).

2. Historia rozwoju technologii Luminex xMAP[®]

Technologia Luminex xMAP[®] rozwinęła się w oparciu na osiągnięciach cytometrii przepływowej i wykorzystuje podstawowe elementy konstrukcyjne cytometru, takie jak urządzenia optyczne oraz lasery jako źródło światła (2), dlatego można ją uznać za pewien rodzaj cytometrii przepływowej.

Cytometr przepływowy umożliwia rozróżnianie i zliczanie komórek oraz różnych cząstek. Badana zawiesina jest analizowana po przekształceniu jej w postać laminarnie płynącego, bardzo cienkiego strumienia, który jest oświetlany wiązką światła laserowego. Każda cząstka obecna w badanej zawieszynie reaguje ze światłem i generuje sygnał. Sygnał jest rejestrowany przez czujniki, a następnie poddawany analizie.

Pierwszy komercyjny cytometr przepływowy wyprodukowano w 1968 r. Jakkolwiek, cytometr przepływowy został opracowany pierwotnie do analizy komórek, może on także służyć do badania małych cząstek, w tym np. mikrokulek. W 1977 r., mikrokulki opłaszczone przeciwciałami użyto do wykrywania antygenów w zawiesinach (3,4). Różnego typu mikrokulki znalazły także zastosowanie w kalibracji cytometrów przepływowych (5).

Za pomocą cytometru przepływowego możliwe jest rozróżnienie cząstek na podstawie ich rozmiaru lub barwy. Wykorzystanie tych możliwości pozwala na zastosowanie mikrokulek, jako nośników o różnych cechach oraz równoczesne przeprowadzenie kilku testów, pozwalających na wykrycie czynników (badanych analitów) w jednej próbie. Rozróżnianie nośników – mikrokulek przez cytometr przepływowy może opierać się na takich ich cechach jak np. wielkość czy intensywność oraz długość emitowanej fali światła fluorescencyjnego.

McHugh i wsp. (6) w swoich badaniach zastosowali mikrokulki polistyrenowe o różnych rozmiarach, które zostały pokryte (opłaszczone) antygenami wirusowymi. Posłużyły one do wykrywania przeciwciał antywirusowych w surowicy krwi ludzkiej. Autorzy zakładali możliwość jednoczesnego użycia od pięciu do dziesięciu rodzajów mikrokulek, różniących się wielkością. Przy takim podejściu pojawił się jednak problem braku możliwości rozróżnienia agregatów mikrokulek o mniejszych rozmiarach od mikrokulek o rozmiarach większych.

Innym rozwiązaniem było wypełnienie polistyrenowych mikrokulek różną ilością zielonego fluorochromu (525 nm). W efekcie uzyskano zróżnicowaną intensywność fluorescencji mikrokulek. Takie podejście jest wykorzystywane w badaniach stężenia cytokin w surowicy krwi (7).

W technologii Luminex xMAP®, aby zwiększyć różnorodność możliwych do wykrycia cząsteczek, zastosowano inne, innowacyjne rozwiązanie. Mikrokulki wypełniono mieszaniną dwóch barwników fluorescencyjnych, stosowanych w różnych stężeniach. W ten sposób uzyskano całą gamę mikrokulek o zróżnicowanym wybarwieniu, wykorzystywanych jako nośniki dla odpowiednich reagentów, np. przeciwciał. Pierwsze publikacje opisujące tę technologię pojawiły się w 1997 r. (8,9). Początkowo określana jako FlowMetrix, oparta była na użyciu do sześćdziesięciu czterech rodzajów mikrokulek o różnej barwie (9). Obecnie w systemie Luminex xMAP można zastosować komercyjnie dostępne zestawy mikrokulek wybarwionych na sto różnych kolorów.

3. Mikrokulki jako nośnik w systemie Luminex xMAP

Mikrokulki używane w technologii Luminex xMAP® wykonane są zazwyczaj z polistyrenu. Ich średnica wynosi około 5,6 μm . Każdy rodzaj mikrokulek wypełniony jest unikatową kombinacją dwóch barwników fluorescencyjnych, zmieszanych w różnych stężeniach; stosuje się dziesięć stężeń fluorochromu czerwonego (wzbudzanego światłem o długości $>620\text{ nm}$) i dziesięć stężeń fluorochromu pomarań-

czowego-podczerwonego (wzbudzanego światłem o długości fali 575 nm). Dzięki zastosowaniu dziesięciu stężeń każdego z dwóch fluorochromów możliwe było otrzymanie stu różnych kombinacji barwnego wypełnienia mikrokulek. Powierzchnia mikrokulek jest następnie pokrywana związkami zawierającymi różne grupy czynne w celu przyłączenia do mikrokulek specyficznych reagentów.

Dostępne komercyjnie mikrokulki mogą mieć powierzchnię pokrytą m.in.:

- związkami zawierającymi grupy karboksylowe (-COOH), – służące do kowalencyjnego wiązania się z grupami aminowymi,
- awidyną – wiążącą biotynylowane ligandy,
- sekwencjami oligonukleotydowymi pełniącymi funkcję sondy (zazwyczaj o długości 24. nukleotydów) do hybrydyzji komplementarnych oligonukleotydów,
- analogami nukleotydowymi (LNA, ang. *Locked Nucleic Acids*[™]) – służącymi do wykrywania miRNA (naturalnie występujących cząsteczek RNA odpowiedzialnych za regulację genów; w analogach nukleotydowych pierścień cukrowy zawiera metylenowy łącznik między tlenem i węglem) znajdującego się w roztworze; włączenie LNA do oligonukleotydów znacząco poprawia powinowactwo do komplementarnych łańcuchów DNA i RNA, prowadząc do zwiększenia specyficzności i stabilności wiązania (2).

Za pomocą wymienionych związków do mikrokulek wiązane są reagenty wykorzystywane do wykrywania szeregu analitów. W zależności od przeznaczenia przeprowadzanego testu, stosuje się jako reagenty na powierzchni mikrokulek np. białka (w tym przeciwciała), peptydy, polisacharydy, lipidy, oligonukleotydy (tab. 1).

Tabela 1

Zestawienie reagentów, grup komplementarnych oraz przykładów wykrywanych związków

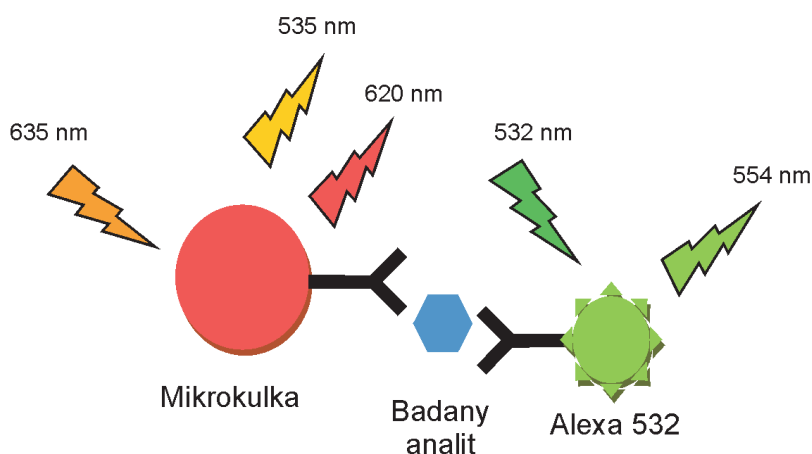
Reagent na mikrokulce	Grupa komplementarna	Wykrywany analit
antygen	przeciwciało	białka, peptydy
przeciwciało	antygen przeciwciało II rzędowe	białka, peptydy
oligonukleotyd	komplementarna sekwencja kwasu nukleinowego	oligonukleotydy, produkty reakcji PCR
awidyna	biotyna	białka, peptydy, oligonukleotydy
hydrazyd	grupy karboksylowe i aldehydowe	białka, peptydy, glikoproteiny, węglowodany
imid kwasu maleinowego	grupy tiolowe	białka
proteina A	przeciwciała	białka, peptydy
proteina G	przeciwciała	białka, peptydy
glutation	S-transferaza glutationu	białka
białko zasadowe mieliny	kinazy (białko zasadowe mieliny jako substrat)	kinazy

Informacje dotyczą komercyjnie dostępnych mikrokulek stosowanych w technologii Luminex xMAP[®] (10,11).

Na powierzchni jednej mikrokulki wiąże się około $1-2 \times 10^6$ cząsteczek. W badaniach przeprowadzonych przez Peters i wsp. (12), wskazano, że w przypadku wykrywania bakterii do jednej mikrokulki może zostać przyłączonych od 3 do 5 komórek bakteryjnych. Jednocześnie objętość mikrokulek jest na tyle mała, że pozostają one w zawieszynie i nie ulegają sedymentacji, co istotnie ułatwia przeprowadzenie reakcji, poprawia jej kinetykę i podwyższa precyzję oznaczeń (8). Niektórzy badacze sygnalizowali jednak problemy z sedymentacją mikrokulek podczas pomiaru ich fluorescencji w płytkach 96-dołkowych (13).

Możliwe jest zastosowanie mikrokulek, które oprócz wypełnienia mieszaniną barwników zawierają substancje wykazujące właściwości magnetyczne (2). Mikrokulki magnetyczne mogą być przesuwane, wyławiane lub zatrzymywane za pomocą pola magnetycznego, co znacznie ułatwia ich wykorzystywanie. Dzięki zastosowaniu pola magnetycznego „zatrzymującego” w probówce mikrokulki magnetyczne, możliwe jest szybkie i efektywne oczyszczenie badanych prób przez wypłukanie niezwiązanych analitów. Tak jak wskazał Peters i wsp. (12), zastosowanie procedury z użyciem mikrokulek magnetycznych powodowało, że podczas odczytu fluorescencji badanych prób niekorzystny sygnał tła ulegał znacznemu zmniejszeniu.

Mikrokulki pokryte specyficznymi reagentami inkubuje się z badaną próbką. Dużym atutem technologii Luminex xMAP® jest niewielka objętość próby potrzebnej do przeprowadzenia testu. W badaniach przeprowadzonych przez Peters i wsp. (12) stwierdzono, że wystarczające jest 50 μ l homogenatu zainfekowanej tkanki roślinnej. Na związanie poszukiwanego czynnika (związku chemicznego lub komórki bakteryjnej z mikrokulkami) wskazuje obecność dodatkowego fluorochromu (tzw. barwnik reporterowy), który może być połączony z reagentem wiążącym wykrywany analit, np. z przeciwciałem (4,12,14), (rys.). Najpopularniejszymi fluorochromami



Rys. Przykładowy kompleks: mikrokulka – przeciwciało pierwszorzędowe – badany analit – przeciwciało drugorzędowe – barwnik reporterowy Alexa 532. Na podstawie (5).

stosowanymi jako barwniki reporterowe w badaniach z zastosowaniem technologii Luminex xMAP[®] są: Alexa532 lub fykoerytyna (12,13,15). Wykrywanie związanych z mikrokulkami cząsteczek (analitu) zachodzi podczas przepływu badanej zawiesiny zawierającej mikrokulki przez kapilarę Luminexu xMAP[®]. Intensywność fluorescencji użytego barwnika reporterowego jest proporcjonalna do ilości badanego analitu związanego do powierzchni mikrokulki. Proces detekcji przeprowadza się zazwyczaj w płytkach 96-dołkowych, w kolejnych studzienkach rozmieszczane są w kilku powtórzeniach kolejne badane próby.

Zastosowanie kilku rodzajów mikrokulek (różniących się zawartością mieszaniny barwników fluorescencyjnych) oraz optymalizacji parametrów tworzenia kompleksu opracowanych oddzielnie dla każdego analitu, pozwala na połączenie kilku oznaczeń i przeprowadzenie ich równocześnie w jednym dołku płytki. Teoretycznie, technologia Luminex xMAP[®] pozwala na jednoczesne wykrywanie i analizę nawet stu różnych cząsteczek (analitów) w jednej próbie (2). Jednak tak jak wskazuje się w literaturze należy pamiętać o tym, że przy prowadzeniu detekcji różnych analitów w jednej próbówce może pojawić się problem ze zbyt wysoką fluorescencją tła lub występowaniem reakcji krzyżowych podczas stosowania mieszaniny przeciwciał (16).

4. Zasada działania analizatora Luminex xMAP[®]

Analiza zawiesiny (próby) zawierającej mieszaninę różnie wybarwionych mikrokulek, do których powierzchni przyłączony jest kompleks, np. pierwszorzędowe przeciwciało połączone z antygenem znajdującym się na powierzchni komórki bakteryjnej oraz przeciwciałem drugorzędowym połączonym z barwnikiem fluorescencyjnym (reporterowym), prowadzona jest przy użyciu urządzenia Luminex xMAP[®]. Każdy utworzony kompleks podczas przepływu zawiesiny przez kapilarę cytometru poddawany jest podwójnej analizie z zastosowaniem dwóch laserów będących źródłem światła o długości fali 635 nm oraz 532 nm (17). Pierwszy laser wzbudza promieniowanie czerwone i podczerwone fluorochromów stanowiących wypełnienie mikrokulek powodując ich identyfikację przez detektor, a co za tym idzie przyporządkowanych im analitów. Drugi laser wywołuje fluorescencję barwnika reporterowego. Obie analizy przebiegają prawie równocześnie, w efekcie otrzymuje się wynik pozwalający na identyfikację czynnika (analitu). Pomiar poszczególnych prób trwa do czasu, gdy w badanej próbce zostanie przeanalizowanych (wykrytych) przez analizator przynajmniej sto mikrokulek (czyli minimum sto powstałych kompleksów) każdego rodzaju (12,18). Obsługa urządzenia Luminex xMAP[®] nie wymaga specjalistycznego przygotowania, ponieważ oprogramowanie, które kontroluje pracę urządzenia, znacznie ułatwia jego użycie (16). Urządzenie Luminex xMAP[®] ma niewielkie rozmiary, pełen zestaw waży około 50 kg i mieści się na stole laboratoryjnym.

5. Zastosowanie technologii Luminex xMAP®

Wachlarz możliwości wykorzystania techniki Luminex xMAP® jest bardzo szeroki. Wiele z nich znajduje się na etapie badań i stanowi ciągle jeszcze tylko potencjalne zastosowanie. Trzeba jednak podkreślić, że technologia ta jest już wykorzystywana w praktyce szczególnie w diagnostyce medycznej np. testach alergicznych (18-20); wykrywaniu chorób autoimmunizacyjnych; wykrywaniu chorób zakaźnych i genetycznych (21); określaniu profili ekspresji genów (22,23); genotypowaniu (24,25); wykrywaniu markerów nowotworowych (26,27); badaniu sygnalizacji komórkowej (28); wykrywaniu cytokin, chemokin oraz czynników wzrostu (29); badaniu poziomu hormonów we krwi (30); badaniu interakcji czynników transkrypcyjnych (4).

Stosuje się ją także do oceny jakości żywności (31,32), ekologii (33), wykrywania broni biologicznej (34) oraz genetycznie zmodyfikowanych organizmów (35).

6. Zastosowanie technologii Luminex xMAP® do wykrywania patogenów roślin

Obok wielu wymienionych dziedzin technologia Luminex xMAP® znalazła także zastosowanie w fitopatologii. W ostatnich kilku latach opracowano metody wykorzystujące tę technologię do wykrywania wirusowych, bakteryjnych i grzybowych patogenów roślin.

Do wykrywania bakterii będących patogenami roślin wykorzystano mikrokulki opłaszczone przeciwciałami (12). Wykrywanie i identyfikacja dotyczyła bakterii z gatunku: *Pectobacterium atrosepticum* (poprzednio *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*) oraz *Dickeya dianthicola* (poprzednio *Erwinia chrysanthemi* pv. *dianthicola*). W badaniach użyto dwóch rodzajów mikrokulek (po jednym rodzaju dla każdego gatunku bakterii) opłaszczonych pierwszorzędowymi przeciwciałami poliklonalnymi skierowanymi przeciwko antygenom obecnym na powierzchni komórek każdego z wykrywanych gatunków bakterii. Przeciwciała drugorzędowe w obu przypadkach sprzężono z barwnikiem Alexa Flour 532. W procedurze wykrywania bakteryjnych patogenów roślin zastosowanej przez Peters i wsp. (12) zakładano możliwość równoczesnego wykrycia komórek dwóch patogenów w badanej próbie. Wykrywanie i identyfikację komórek bakteryjnych prowadzono w płytkach 96-dołkowych z pominięciem etapu płukania zawiesiny, w celu skrócenia czasu i uproszczenia wykonywania badania. Analizowano po 100 mikrokulek każdego rodzaju. Czas badania dla jednej próby z jednego dołka płytki 96-dołkowej wyniósł 10 sekund, a analiza całej płytki trwała 20 minut. Natomiast przygotowanie pomiarów oraz inkubacja prób trwała około 2 godzin.

Aby podnieść specyficzność oraz obniżyć próg wykrywalności komórek bakteryjnych zastosowano także tzw. wzbogacenie badanej próby (ang. *sample enrichment*). Metoda wzbogacania prób jest także stosowana przed wykonywaniem testów ELISA (ang. *Enrichment-ELISA*) lub PCR (ang. *Enrichment-Polimerase Chain Reaction*), a polega

na wcześniejszym namnożeniu bakterii na pożywce selektywnej dla wykrywanego patogena. Efektem tego jest z jednej strony wzbogacenie próbki w komórki poszukiwanych patogenów oraz ograniczenie populacji innych organizmów. Z drugiej jednak strony etap wzbogacania próby znacznie wydłuża czas potrzebny do wykrycia i identyfikacji patogena. W przypadku optymalizacji testów pozwalających na wykrywanie bakterii z gatunków *P. atrosepticum* oraz *D. dianthicola* czas inkubacji (wzbogacenia prób) wynosił 48 godzin (12). W badaniach tych równolegle z zastosowaniem technologii Luminex xMAP[®] przeprowadzono wykrywanie bakterii za pomocą testu ELISA. Do testu ELISA użyto takich samych przeciwciał poliklonalnych, które stosowano w metodzie z zastosowaniem systemu Luminex xMAP[®]. W przypadku oznaczeń prowadzonych bez wzbogacania próby, czułość obu metod, była podobna i wynosiła 10^6 - 10^7 jtk/ml homogenatu tkanki bulw ziemniaka. Natomiast przy zastosowaniu wzbogacenia próby, czułość testu z użyciem Luminexu xMAP[®] była większa i wyniosła 10^2 - 10^3 jtk/ml homogenatu tkanki bulw ziemniaka (w przypadku ELISA czułość testu wyniosła 10^4 - 10^5 jtk/ml) (12). Przyczyny tej różnicy należy szukać w relatywnie dużych rozmiarach używanego w teście ELISA enzymu: alkalicznej fosfatazy. Przeciwciała sprzęgnięte z tym enzymem mogą się z mniejszą wydajnością wiązać z antygenami niż przeciwciała związane z relatywnie małą cząsteczką barwnika reporterowego: Alexa532, stosowaną w technologii Luminex xMAP[®].

Dunbar i wsp. (14) wykazali, że w przypadku wykrywania ludzkich patogenów bakteryjnych za pomocą technologii Luminex xMAP[®] (także z zastosowaniem mikrokulek opłaszczonych przeciwciałami) poziom wykrywalności był wyższy i wahał się od 2,5 do 5×10^2 jtk/ml. Badacze opracowujący technologię wykrywania patogenów roślin tłumaczą tę różnicę zastosowaniem innych przeciwciał i różnicą w budowie antygenów różnych komórek bakteryjnych (12). Nie bez znaczenia pozostaje także fakt, że przy identyfikacji ludzkich patogenów zastosowano przeciwciała sprzęgnięte z fluorochromem (fykoerytyną) za pomocą kompleksu biotylna – streptawidyna. Takie rozwiązanie nie jest możliwe w przypadku wykrywania patogenów roślin, gdyż homogenaty tkanek roślinnych zawierają związki chemiczne, które są inhibitorami reakcji wiązania streptawidyny do biotylny. Zastosowanie kompleksu biotylna – streptawidyna wymagałoby wprowadzenia etapu płukania, a założeniem opracowywanej technologii było opracowanie prostej i szybkiej procedury wykrywania i identyfikacji bakterii w systemie multiplex Luminex xMAP[®].

W przypadku identyfikacji patogenów z naturalnie zainfekowanych tkanek bulw ziemniaka, wyniki otrzymane z zastosowaniem technologii Luminex xMAP[®] były także lepsze w porównaniu z wynikami otrzymanymi w testach ELISA. Podsumowując, główną zaletą opartej na Luminex'ie xMAP[®] technologii wykrywania patogenów jest wysoka czułość, prostota i szybkość wykonywania testu oraz możliwość wykrywania dwóch patogenów w jednej próbce badanej tkanki (12).

Bergervoet i wsp. (36,37) opracowali metodę wykrywania i identyfikacji wirusów roślinnych: wirusa liściozwoju ziemniaka (PLRV), wirusa Y ziemniaka (PVY) oraz wirusa X ziemniaka (PXY) za pomocą technologii Luminex xMAP[®]. Podobnie jak w przypad-

ku wykrywania bakterii wykorzystano specyficzne przeciwciałami którymi opłaszczono mikrokulki magnetyczne. Zastosowanie tego rodzaju mikrokulek pozwoliło na wprowadzenie łatwego do przeprowadzenia etapu płukania. Było to szczególnie istotne przy jednoczesnym wykrywaniu kilku patogenów w próbce, gdyż w takim przypadku w badanej zawieszynie występuje wiele niezwiązanych przeciwciał zawierających fluorochromy, co może utrudniać pomiar ze względu na wysokie tło. Zaproponowana procedura wykrywania patogenów wirusowych trwała 60 minut od momentu przygotowania prób do otrzymania wyników, które były porównywalne do tych otrzymywanych w teście ELISA (36). Dodatkowym atutem zastosowania mikrokulek magnetycznych i płukania próby jest możliwość usunięcia z badanej próby inhibitorów zawartych w tkankach roślinnych (36).

Technologia Luminex xMAP® została także zastosowana do wykrywania grzybów z rodzaju *Fusarium*, które są przyczyną ważnych gospodarczo chorób zbóż (38). Niektóre gatunki *Fusarium*, m.in. *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum*, *Microdochium nivale*, produkują mykotoksyny. Standardowa identyfikacja tych patogenów wiąże się z czasochłonną obserwacją mikroskopową. Technologia Luminex xMAP® pozwala na szybsze i efektywniejsze wykrywanie tych grzybów. W tym przypadku opiera się ona na wykorzystaniu produktów reakcji PCR, które są znakowane barwnikiem fluorescencyjnym. Produkty PCR są wiązane z mikrokulkami na powierzchni których umieszczono oligonukleotydowe sondy, zawierające sekwencje DNA homologiczne do sekwencji amplifikowanych w reakcji PCR fragmentów genów *Fusarium* (39).

Natomiast Ishii i wsp. (40) użyli systemu PCR – Luminex xMAP® do wykrywania szczepów grzyba *Magnaporthe grisea* odpornych na fungicyd MBI-D (ang. *Melanin Biosynthesis Inhibitors*) na bazie genu kodującego białko będące celem działania fungicydu. Opisywana technologia daje możliwości wykrywania patogenów oraz przeciwciał przeciwko danemu patogenowi w organizmach zwierzęcych (tab. 2).

Tabela 2

Przykłady zastosowań technologii Luminex xMAP® do wykrywania patogenów

Grupy organizmów	Wirusy	Bakterie	Grzyby	Pierwotniaki
1	2	3	4	5
patogeny ludzkie i zwierzęce	HCV wirus zapalenia wątroby typu C, HIV ludzki wirus upośledzenia odporności (41)	<i>Ralstonia picketti</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Burkholderia cepacia</i> (42), <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (43), <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Campylobacter jejuni</i> (14) <i>Shigella flexneri</i> , <i>Salmonella typhimurium</i> (44)	<i>Cryptococcus neoformans</i> (45), <i>Trichosporon</i> (46), <i>Candida albicans</i> (47)	<i>Plasmodium falciparum</i> (48)

1	2	3	4	5
patogeny roślin	wirus liściozwoju ziemniaka (PLRV), wirus Y ziemniaka (PVY), wirus X ziemniaka (PXY) (36,37)	<i>Pectobacterium atrosepticum</i> , <i>Dickeya dianthicola</i> (12)	<i>Fusarium graminearum</i> , <i>Fusarium culmorum</i> , <i>Microdochium nivale</i> (39)	

Wspomniano już, że jednoczesne wykrywanie kilku patogenów pozwala na oszczędność czasu, a jednocześnie sama procedura badania z użyciem Luminex'u xMAP[®] jest także mniej czasochłonna. Czas wykonywania testu z zastosowaniem systemu Luminex xMAP[®] wynosi około jednej godziny, czas trwania testu ELISA to około sześć godzin (12), przy porównywalnej czułości metod. Nie bez znaczenia jest fakt, że w technologii Luminex xMAP[®] reakcja zachodzi pomiędzy związkami umieszczonymi na mikrokulkach a analitem znajdującym się w roztworze. W ten sposób skraca się droga dyfuzji, co poprawia kinetykę reakcji (34). Wynik testu wyliczany jest z niezależnych pomiarów 100-200 mikrokulek, co w sposób oczywisty przyczynia się do większej precyzji badań niż w przypadku testu ELISA (13).

W przypadku wysokiego sygnału tła etap płukania próby, wydłużający czas trwania badania może okazać się niezbędny. Przy zastosowaniu standardowych mikrokulek można użyć membran do filtracji badanych prób, jednak wiąże się to ze stratami mikrokulek oraz czyni metodę bardziej czasochłonną. Optymalnym rozwiązaniem, jak się wydaje, jest zastosowanie mikrokulek magnetycznych ułatwiających przeprowadzenie płukania i pozbycia się zanieczyszczeń. Dodatkowo technologia Luminex'u xMAP[®] daje możliwość automatyzacji poprzez zastosowanie automatycznego pipetowania oraz analizatora Luminex HTS (12).

McHugh i wsp. (6) uważają, że aparat Luminex xMAP[®] jest na tyle mały, solidny, a działanie stabilne, że może być częścią mobilnego laboratorium, co oznacza, iż detekcję patogenów przy zastosowaniu tego urządzenia można by wykonywać na polu.

Komercyjnie dostępne są zestawy, które zawierają odczynniki potrzebne do wykrywania w technologii Luminex xMAP[®] kilku analitów jednocześnie, jednak są to zestawy wykorzystywane w diagnostyce medycznej natomiast, obecnie brak jest takich zestawów do wykrywania patogenów roślin.

7. Podsumowanie

Zastosowanie technologii Luminex xMAP[®] umożliwia wykrywanie patogenów bezpośrednio w tkance roślinnej w stosunkowo krótkim czasie. Ważny jest także fakt jednoczesnego wykrywania kilku czynników chorobotwórczych w jednej próbie. Chociaż możliwości równoczesnego wykrywania patogenów roślin daje techno-

logia multiplex PCR, to jednak w tym przypadku, wykrywanie ograniczone jest jedynie do kwasów nukleinowych. Przy zastosowaniu technologii Luminex'u xMAP® możemy wykrywać dowolne anality w zależności od zastosowanego opłaszczenia mikrokulek. Co więcej, w jednym badaniu możemy połączyć testy pozwalające na wykrywanie różnego rodzaju cząsteczek. Technologię opartą na Luminex'ie xMAP® można porównać do technologii wykorzystujących mikromacierze, ale jest ona łatwiejsza do optymalizacji nowych testów pozwalających na wykrywanie patogenów (36).

Literatura

1. Agrios G. N., (2004), *Plant Pathology*, Elsevier Academic Press, V, New York.
2. www.luminexcorp.com
3. Horan P. K., Wheelless L. L., (1977), *Science*, 198, 149-157.
4. Iannone M. A., Consler T. G., Pearce K. H., Stimmel J. B., Parks D. J., Gray J. G., (2001), *Cytometry*, 44, 326-337.
5. Vignali D. A., (2000), *J. Immunol. Methods*, 243(1-2), 243-255.
6. McHugh T. M., Miner R. C., Logan L. H., Stites D. P., (1988), *J. Clin. Microbiol.*, 26(10), 1957-1961.
7. Camilla C., Mely L., Magnan A., Casano B., Prato S., Debono S., Montero F., Defoort J. P., Martin M., Fert V., (2001), *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 8(4), 776-784.
8. Fulton R. J., McDade R. L., Smith P. L., Kienker L. J., Kettman Jr. J. R., (1997), *Clin. Chem.*, 43, 1749-1756.
9. Gordon R. F., McDade R. L., (1997), *Clin. Chem.*, 43(9), 1799-1801.
10. www.radixbiosolutions.com/modified_beads/index.html
11. www.upstate.com
12. Peters J., Śledz W., Bergervoet J. H. W., van der Wolf J. M., (2007), *Eur. J. Plant Pathol.*, 117(2), 97-107.
13. Dasso J., Lee J., Bach H., Mage R. G., (2003), *J. Immunol. Methods*, 263(1-2), 23-33.
14. Dunbar S. A., Vander Zee C. A., Oliver K. G., Karem K. L., Jacobson J. W., (2003), *J. Microbiol. Methods*, 53(2), 245-252.
15. Bonfield T. L., John N., Barna B. P., Kavuru M. S., Thomassen M. J., Yen-Lieberman B., (2005), *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 12(7), 821-824.
16. Earley M. C., Vogt Jr. R. F., Shapiro H. M., Mandy F. F., Kellar K. L., Bellisario R., Pass K. A., Marti G. E., Stewart C. C., Hannon W. H., (2002), *Cytometry*, 50(5), 239-242.
17. Manual, (2004), Luminex100™ IS User Manual version 2.3., Luminex Corporation.
18. Kellar K. L., Kalwar R. R., Dubois K. A., Crouse D., Chafin W. D., Kane B. E., (2001), *Cytometry*, 45, 27-36.
19. Earle C. D., King E. M., Tsay A., Pittman K., Saric B., Vailes L., Godbout R., Oliver K. G., Chapman M. D., (2007), *J. Allergy Clin. Immunol.*, 119(2), 428-433.
20. Whitehead G. S., Walker J.K., Berman K. G., Foster W. M., Schwartz D. A., (2003), *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, 285, 32-42.
21. Dunbar S. A., Jacobson J. W., (2005), *Methods Mol. Med.*, 114, 147-1471.
22. Naciff J. M., Richardson B. D., Oliver K. G., Jump M. L., Torontali S. M., Juhlin K. D., Carr G. J., Paine J. R., Tiesman J. P., Daston G. P., (2005), *Environ. Health Perspect.*, 13(9), 1164-1171.
23. Yang L., Tran D. K., Wang X., (2001), *Genome Res.*, 11(11), 1888-1898.
24. James D., (1999), *J. Virol. Methods*, 83, 1-9.
25. Hurley J. D., Engle L. J., Davis J. T., Welsh A. M., Landers J. E., (2004), *Nucleic Acids Res.*, 32(22), 186.
26. McIntire K. R., Vogel C. L., Princler G. L., Patel I. R., (1972), *Cancer Res.*, 32(9), 1941-1946.

27. Chen W., Li M., Wu Y., Li M., He Y., (2007), *Acad. J. Sun Yat Sen Univ. Med. Sci.*, 28(1), 105-109.
28. Rhyne P. W., Scull J. D., Stiles L. M., Eisinger D. P., (2003), *Biotechniques*, 35(3), 624-629.
29. de Jager W., te Velthuis H., Prakken B. J., Kuis W., Rijkers G. T., (2003), *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 10(1), 133-139.
30. Bellisario R., Colinas R.J., Pass K. A., (2000), *Clin. Chem.*, 46 (9), 1422-1424.
31. Haasnoot W., Pre J. G., (2007), *J. Agric. Food Chem.*, 55 (10), 3771-3777.
32. Anderson G. P., Lamar J. D., Charles P. T., (2007), *Environ. Sci. Technol.*, 41(8), 2888-2893.
33. Biagini R. E., Smith J. P., Sammons D. L., McKenzie B. A., Striley C. A., Robertson S. K., Snawder J. E., (2004), *Anal. Bioanal. Chem.*, 379(3), 368-374.
34. McBride M. T., Gammon S., Pitesky M., O'Brien T. W., Smith T., Aldrich J., Langlois R. G., Colston B., Venkateswaran K. S., (2003), *Anal. Chem.*, 75, 1924-1930.
35. Fantozzi A., Ermolli M., Marini M., Scotti D., Balla B., Querci M., Langrell S. R. H., van den Eede G., (2007), *J. Agric. Food Chem.*, 55(4), 1071-1076.
36. Bergervoet J. H. W., Peters J., van Beckhoven J. R. C. M., van Bovenkamp G. W., Jacobson J. W., van der Wolf J. M., (2006), *Planet xMAP Europe scientific and technology symposium (formerly xSAMPLES)*, Amsterdam, 10.
37. Bergervoet J. H. W., Peters J., van Beckhoven J. R. C. M., van den Bovenkamp G. W., Jacobson J. W., van der Wolf J. M., (2008), *J. Virol. Methods*, 149 (1), 63-68.
38. Parry D. W., Jenkinson P., McLeod L., (1995), *Plant Pathol.*, 44(2), 207-238.
39. Ishii H., Chung W. H., Kaneko I., Nishimura K., (2005), *The Second Asian Conference on Plant Pathology*, Singapore, 15-16.
40. Ishii H., (2006), *Jpn. Agr. Res. Q.*, 40 (3), 205-211.
41. Smith P. L., WalkerPeach C. R., Fulton R. J., DuBois D. B., (1998), *Clin. Chem.*, 44, 2054-2060.
42. Ye F., Li M. S., Taylor J. D., Nguyen Q., Colton H. M., Casey W. M., Wagner M., Weiner M. P., Chen J., (2001), *Hum. Mutat.*, 17, 305-316.
43. Cowan L. S., Diem L., Brake M. C., Crawford J. T., (2004), *J. Clin. Microbiol.*, 42, 474-477.
44. Straub M. T., Dockendorff B. P., Quinonez-Diaz M. D., Valdez C. O., Shutthanandan J. I., Tarasevich B. J., Grate J. W., Bruckner-Lea C. J., (2005), *J. Microbiol. Methods*, 62(3), 303-316.
45. Diaz M. R., Fell J. W., (2005), *J. Clin. Microbiol.*, 43(8), 3662-3672.
46. Diaz M. R., Fell J. W., (2004), *J. Clin. Microbiol.*, 42, 3696-3706.
47. Page B. T., Kurtzman C. P., (2005), *J. Clin. Microbiol.*, 43(9), 4507-4514.
48. McNamara D. T., Kasehagen L. J., Grimberg B. T., Cole-Tobian J., Collins W. E., Zimmerman P. A., (2006), *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 74(3), 413-421.