

MAGNETISCHER IMMUNOASSAY ZUR DETEKTION VON PFLANZENPATHOGENEN

MAGNETIC IMMUNOASSAY FOR PLANT PATHOGEN DETECTION

Hintergrund und Ziele

Pflanzenpathogene, wie z. B. Pflanzenviren und Pilze, führen durch Ernteauffälle weltweit zu erheblichen ökonomischen Schäden. Die frühzeitige Identifizierung und Quantifizierung pathogener Befalls bei Kulturpflanzen ist von entscheidender Bedeutung, um rechtzeitig Gegenmaßnahmen ergreifen zu können. Derzeit existieren keine geeigneten Schnelltests, die in ihrer Sensitivität vergleichbar mit einer zeit- und kostenintensiven Laboruntersuchung sind. Hier besteht somit erheblicher Bedarf für ein Nachweisverfahren, das vom Landwirt selbst preiswert und schnell vor Ort durchgeführt werden kann.

Im Rahmen eines Forschungsvorhabens sollte ein einfach zu handhabendes und vor Ort einsetzbares Diagnoseverfahren für virale und pilzliche Pflanzenpathogene entwickelt werden. Die Detektion sollte analog zu den derzeit überwiegend praktizierten serologischen Nachweisen durch spezifische Antikörper erfolgen.

Projektbeschreibung

Durch Etablierung eines neuartigen magnetischen Immunodetektionsverfahrens sollen Antikörper-Antigen-Interaktionen mit Hilfe magnetischer Nanopartikel detektiert werden. Mit Hilfe eines vom Kooperationspartner, dem Institut für Bio- und Nanosysteme 2 des Forschungszentrums Jülich, entwickelten Magnetreaders lassen sich Antikörper-konjugierte Magnetpartikel auf Basis der Frequenzmischungstechnologie zuverlässig quantifizieren. Durch spezifisches Binden des Antikörper-konjugierten Labels an Pflanzenpathogene in einer zu untersuchenden Probe soll eine schnelle, zuverlässige und hochsensitive Detektion von Pathogenbefall ermöglicht werden. Im Rahmen des Projektes sollen Detektionsassays für mehrere Pflanzenpathogene entwickelt und bewertend verglichen werden. Das Nachweisverfahren soll so modifiziert werden, dass ein mobiler Einsatz im Feld ohne Einsatz von Fachpersonal möglich ist.

Ergebnisse

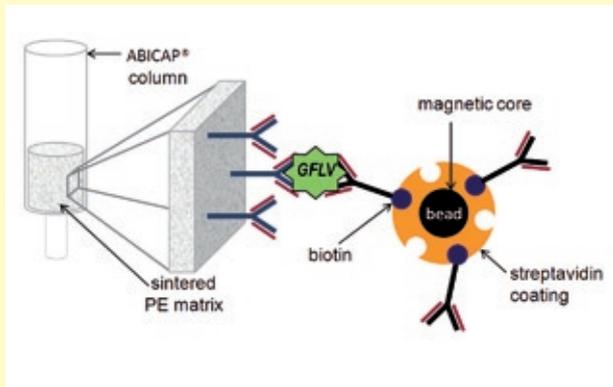
Es wurden erfolgreich monoklonale Antikörper gegen den Pflanzenvirus *Grapevine fanleaf virus* (GFLV) sowie gegen die Schimmelpilze *Aspergillus flavus* und *A. parasiticus* hergestellt. Eine Immobilisierung der Antikörper an Magnetpartikeln erfolgte durch Biotin-Streptavidin-Bindung (Figure 1). Zur Anreicherung von magnetischen Nanopartikeln mit gebundenen Pathogenen wurden Filtrationssäulen (ABICAP®-System) mit einer Festphase aus einem Polyethylensinterkörper verwendet. Die Säulenmatrix wurde adsorptiv mit Extraktionsantikörpern beladen und Pflanzenextrakt hindurch geleitet. Je nach Konzentration des Analyten in der Probe wurden konzentrationsabhängige Mengen des Magnetpartikel-Antikörper-Konjugates in der Matrix zurückgehalten und ließen sich mit Hilfe des Magnetreaders quantifizieren. Die Zuverlässigkeit des Detektionsprinzips konnte bereits für GFLV demonstriert werden. Hierbei konnten Detektionsgrenzen erreicht werden, die vergleichbar, z. T. sogar besser als bei kommerziell verfügbaren ELISA-Systemen waren. So ergab sich ein linearer Detektionsbereich zwischen 100-500 ng/mL und ein Detektionslimit von etwa 1 ng Antigen pro mL Probenvolumen (Figure 2).

Fazit

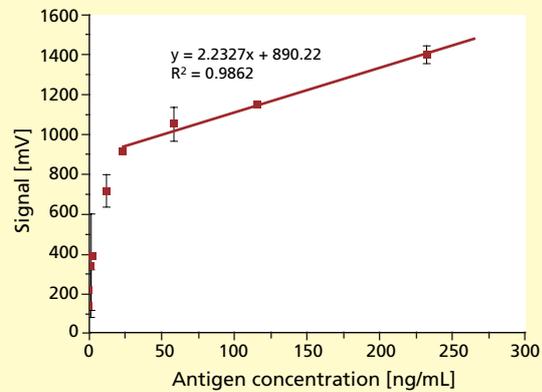
Im Rahmen dieses Projektes konnte gezeigt werden, dass mit Hilfe des neuartigen magnetischen Immunoassays zuverlässig infizierte Pflanzen identifiziert werden können. Die Sensitivität ist vergleichbar mit anderen laborbasierten Analysemethoden. Allerdings erfolgt der spezifische Nachweis der Pathogene etwa dreimal schneller als mit herkömmlichen Methoden wie ELISA.

Kooperationspartner / Cooperation partner

Institut für Bio- und Nanosysteme 2, Forschungszentrum Jülich GmbH



F1



F2

Background and aims

Plant pathogens such as viruses and fungi have a severe impact on crops worldwide and lead to considerable economic losses. The early identification and quantification of crop pathogens is therefore vitally important to prevent the spread of such diseases. Field-based diagnostic tests comparable in sensitivity to time-consuming and expensive laboratory tests are not currently available, so there is great interest in the development of rapid and inexpensive tests that can be applied in the field.

The emphasis of this research project was to develop convenient and mobile diagnostic assays for plant viruses and fungi, with detection based on specific antibodies, comparable to the well established serological analysis methods used in the laboratory.

Approach

A novel magnetic immunodetection assay was established in which antibody-antigen interactions were detected using magnetic nanoparticles. The antibody-conjugated magnetic particles were accurately quantified using frequency mixing technology and a magnetic reader recently developed by our cooperation partner, the Forschungszentrum Jülich Institute of Bio- and Nanosystems 2, allowing rapid, sensitive and reliable detection of labeled antibodies binding to pathogens in plant samples. We developed and evaluated detection assays for several plant pathogens and we adapted the detection principle so that it could be applied in the field using portable equipment without the need for specially-trained personnel.

Results

We successfully produced monoclonal antibodies against the plant virus *Grapevine fanleaf virus* (GFLV) and the fungi *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. Antibody immobilization on magnetic beads was achieved by biotin-streptavidin binding. Magnetic nanoparticles carrying captured pathogens

accumulated in special filtration columns (ABICAP® system) with a sintered polyethylene matrix (Fig. 1), which had previously been loaded with extraction antibodies by adsorption. Plant extract was passed through the matrix, and antibody-conjugated beads were retained depending on the analyte concentration in the sample. Subsequently the bead concentration within the matrix (and thus the amount of pathogen) was quantified using the magnetic reader. The reliability of the detection principle was demonstrated for GFLV, where we achieved detection sensitivity comparable to or even better than commercially available ELISA systems. This resulted in a linear detection range between 100 and 500 ng/ml and a detection limit in the range of 1 ng antigen per ml sample volume (Fig. 2).

Conclusion

We were able to demonstrate that a novel magnetic immunoassay could be used reproducibly to identify pathogen-infected plants with a sensitivity comparable to established laboratory-based analysis methods, but our new method was approximately three times faster than conventional procedures such as ELISA.

Contact / Ansprechpartner

Dr. Stefan Schillberg
Tel: +49 241 6085 - 11050
stefan.schillberg@ime.fraunhofer.de

Dr. Florian Schröper
Tel: +49 241 6085 - 13012
florian.schroeper@ime.fraunhofer.de

Figure 1: Antibody-mediated capture of plant virus particles in ABICAP matrix and the magnetic labeling principle

Figure 2: Calibration curve for the detection of GFLV in plant extracts. Signals were obtained from the magnetic reader by frequency mixing.