

**ОТРИМАННЯ ПРЕПАРАТІВ ВІРУСУ АУКУБА
МОЗАЇКИ КАРТОПЛІ ДЛЯ ВИРОБНИЦТВА
ДІАГНОСТИЧНОЇ СИРОВАТКИ ТА
ІМУНОЛОГІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ**

Дмитрук О.О., Мамчур О.Є., Коломієць Л.П.

Інститут сільськогосподарської мікробіології УААН
вул. Шевченка, 97, м. Чернігів, 14027, Україна
E-mail: dmitruk.oo@mail.ru

Розроблено ефективні методи отримання препаратів вірусу аукуба мозаїки картоплі (ВАМК) з високим ступенем чистоти та підвищеним виходом вірусу (до 280 мг/кг), які можуть бути використані для виготовлення антигену ВАМК при отриманні специфічних антисироваток та проведенні імунохімічних реакцій.

Ключові слова: вірус аукуба мозаїки картоплі, очищення і концентрація вірусу.

Захист рослин є важливою ланкою сучасного землеробства, сталий розвиток якого не можливий без вирішення проблем, пов'язаних з розвитком та розповсюдженням вірусних хвороб рослин в агроценозах. Розробка методів імунодіагностики для контролю вірусного ураження насаджень картоплі потребує досліджень, спрямованих на оптимізацію умов отримання біологічних компонентів тест-систем. Невід'ємною частиною цих досліджень є виділення, очищення й концентрування вірусних антигенів та контроль їх якості. Очищений вірусний препарат має містити віріони певного вірусу або його штаму, ідентичного за морфологією, розміром, біологічною активністю та фізико-хімічними властивостями без сторонніх домішок [1].

Вірус аукуба мозаїки картоплі (*Potato aucuba mosaic virus*), представник роду *Potexvirus* родини *Flexiviridae*, є +РНК-вмісним вірусом з одноланцюговою нуклеїновою кислотою, послідовність нуклеотидів якої повністю визначена. Вірус має нитковидні віріони з модальною довжиною 580 нм та діаметром 11-13 нм [2-4]. ВАМК відносно стабільний та накопичується в рослинах у значних кількостях [4, 5], але перешкодою для одержання очищених препаратів є схильність вірусу до агрегації та деградація білка під дією протеолітичних ферментів [6, 7]. Розробка специфічних,

високочутливих і простих у використанні методів імунодіагностики вірусу аукуба мозаїки картоплі вимагає високоочищених та сконцентрованих вірусних антигенів, що дає змогу уникнути неспецифічних реакцій при проведенні аналізів.

Метою нашої роботи була розробка ефективних методів отримання чистих препаратів ВАМК для виробництва антисироватки та імунологічних досліджень.

Матеріали і методи. У роботі використовували штам вірусу аукуба мозаїки картоплі (ВАМК-об), виділений з рослин картоплі сорту Обелікс в агроценозах Полісся України.

ВАМК накопичували на рослинах-індикаторах *Nicotiana rustica* L., які вирощували в умовах вегетаційної камери при 20-22 °С і фотоперіоді 16 годин. Заражали рослини у фазу 3-4 справжніх листків методом механічної інокуляції. Листки махорки відбирали на 14-18 добу після інфікування, коли концентрація вірусу у рослинах сягала максимуму.

Очищення та концентрування ВАМК проводили за двома схемами, які передбачали:

схема 1 – без застосування органічних розчинників, осадження вірусу ПЕГ згідно з відомими методиками [7-10] та препаративний електрофорез із застосуванням сахарозної подушки (40 %) [11, 12]; електрофорез проводили у лужній системі буферів протягом 3 годин за температури 16-20 °С, сили струму 8-10 мА та напруги 400-550 В;

схема 2 – використання органічних розчинників з наступним осадженням сульфатом амонію та подальшим очищенням препарату методом гель-хроматографії на колонці з сефадексом G-50 в електричному полі [13].

Контроль етапів отримання чистих препаратів ВАМК проводили методами спектрофотометрії, крапельної аглютинації та електронної мікроскопії нативних препаратів, контрастованих 2 %-ним розчином фосфорно-вольфрамової кислоти. Досліджували препарати в електронних мікроскопах Tesla-540 та EM-125 при інструментальному збільшенні 20 тис. Вихід очищеного вірусу визначали за допомогою коефіцієнта екстинції ВАМК $E_{260}^{0,1\%}=2,6$.

Результати та їх обговорення. Ефективність отримання препаратів вірусу аукуба мозаїки картоплі оцінювали по загальному виходу вірусу (мг вірусу з 1 кг рослинної маси), ступеню агрегації вірусних часток та чистоти вірусних препаратів.

Для підвищення ефективності екстракції вірусу та блокування дії ферментів рослинного соку проводили інфільтрацію інфекційного матеріалу в 0,3 М трис-гліциновому буферному розчині рН 8,3 з додаванням як стабілізаторів 0,1 % 2-меркаптоетанолу та 0,01 М етилендіамінотетраоцтової кислоти. Застосування трис-гліцинового буферного розчину, на відміну від фосфатного чи цитратного, зменшувало вміст у препараті пігменту, що значно поліпшувало наступні етапи очистки (особливо етап препаративного електрофорезу).

Згідно з першою схемою очищення для первинного освітлення інфекційного екстракту не використовували органічних розчинників, які різко знижують вихід вірусу. Для освітлення екстрактів з інфікованих ВАМК рослин *Nicotiana rustica L.* ефективним виявилось застосування 20 % розчину Тритона X-100, який сприяє десорбції вірусу від клітинних мембран і хлоропластів, що значно прискорює подальше очищення вірусного препарату.

Для осадження вірусу використали поліетиленгліколь (ПЕГ) з молекулярною масою 40000, який додавали до екстракту з розрахунку 8 % (маса/об'єм). При цьому спостерігається значна агрегація вірусних часток. Для вивільнення вірусу із осаду необхідно було провести цикл (5-6 екстракцій) диференційного центрифугування сконцентрованого ПЕГ препарату [7, 10]. Агрегати вірусних часток при низькошвидкісному центрифугуванні неминуче втрачаються, внаслідок чого знижується загальний вихід вірусу. Тому, за розробленою нами методикою, на цьому етапі було використано препаративний електрофорез із застосуванням 40 % сахарозної подушки. Отримано препарати ВАМК з виходом вірусу до 280 мг/кг листя махорки.

За схемою 2 первинне освітлення інфекційного соку проводили з використанням суміші хлороформ-бутанолу (1:1) у пропорції 1/8, що дозволяє звільнити екстракт ВАМК від білок-хлорофілового комплексу. Після центрифугування при 3000 об./хв протягом 15 хвилин до надосаду додавали сульфат амонію до кінцевої концентрації 30 %, ретельно перемішували і центрифугували при 6000 об./хв протягом 30 хвилин. Осад ресуспендували у мінімальній кількості 0,01 М трис-гліцинового буферу рН 8,3. Подальше очищення проводили, застосовуючи метод гель-хроматографії на колонці з сефадексом G-50 в електричному полі, використовуючи ефект електрофоретичного гальмування,

що дозволяє уникнути розбавлення вірусного препарату. Елюцію проводили у лужній системі буферів, силі струму 10 мА та напрузі 280 В. Фракції починали відбирати після входження проби у сефадекс та переполюсовки системи. Відібрані фракції аналізували серологічно та спектрофотометрично при 280 нм. Проби, які містили ВАМК, об'єднували та концентрували ультрацентрифугуванням 2 год. за 35000 об./хв. Осад ресуспендували у мінімальній кількості фізрозчину і використовували як антиген. Отримано препарати ВАМК з виходом вірусу до 145 мг/кг листя махорки.

Електронномікроскопічні дослідження вірусного антигену, сконцентрованого та очищеного за першою схемою показали, що у препараті спостерігається велика кількість агрегатів ВАМК; залишків клітинних компонентів та фрагментів деградації вірусних часток не виявлено. У препаратах, очищених за схемою 2, виявлено характерні за морфологічними ознаками частки та їх уламки, агрегованих часток не спостерігали (рис. 1).

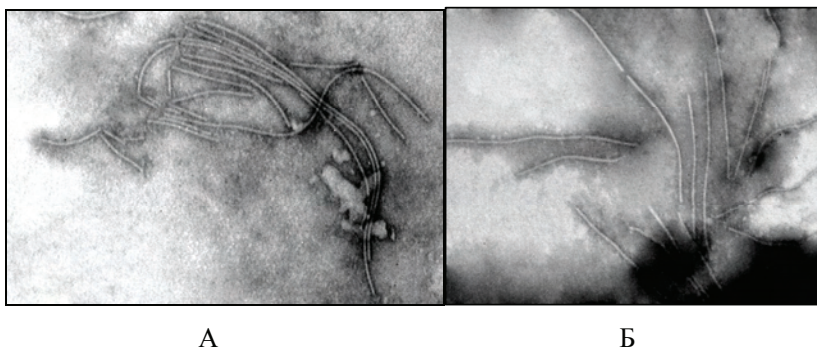


Рис. 1. Препарати ВАМК, очищені за схемою 1(А) та схемою 2(Б), інструментальне збільшення 20 тис.

Очищені вірусні препарати ВАМК були прозорими з легкою опалесценцією. Спектр поглинання очищених препаратів, отриманих за схемою 1, мав характерний максимум при довжині хвилі 265 нм, мінімум – при 247 нм (рис. 2). Співвідношення E_{260}/E_{280} становило 1,1, що можна пояснити підвищеним ступенем агрегації вірусних часток. Максимум поглинання УФ-світла вірусним препаратом, очищеним відповідно схеми 2, реєстрували при 270 нм, мінімум – при 245 нм (рис. 2), величина співвідношення E_{260}/E_{280} становила 1,2, що відповідає характеристикам очищеного

препарату ВАМК [4, 7].

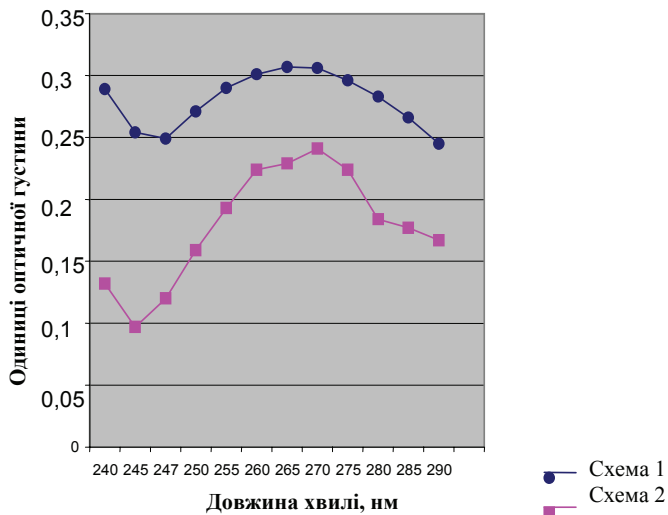


Рис. 2. Поглинання УФ-світла очищеними препаратами ВАМК

Очищені препарати ВАМК у подальшому були використані як антигени для імунізації тварин та проведення імунологічних досліджень.

За нашими даними, очищення ВАМК за схемами 1 та 2 дозволило отримати препарати вірусу, які характеризуються високим ступенем чистоти, що є важливим при проведенні імунохімічних реакцій. Для виготовлення антигену ВАМК при отриманні специфічних антисироваток більш ефективною є схема 1 з підвищеним виходом вірусу, яка включає інфільтрацію інфекційного матеріалу в 0,3 М трис-гліциновому буферному розчині, рН 8,3 з додаванням 0,1 % ME та 0,01М ЕДТА, освітлення 20 %-ним розчином Тритон X-100, первинне концентрування вірусу 8 % поліетиленгліколем, препаративний електрофорез із застосуванням 40 % сахарозної подушки.

1. Мельничук М.Д. Фітовірусологія: Навчальний посібник /М.Д. Мельничук. – К.: Поліграф Консалтинг, 2005. – 200 с.

2. Adams M.J. The new plant virus family *Flexiviridae* and assessment of molecular criteria for species demarcation /Adams M.J., Antoniw J.F., Bar-Joseph M. et al. //Arch. Virol. – 2004. – Vol. 149, № 5. – P. 1045-1060.

3. Xu H. The entire nucleotide sequence and genomic organization of potato aucuba mosaic potexvirus /Xu H., Leclerc D., Leung B. and Abou Haidar M.G. //Arch. Virol. – 1994. – Vol. 135, № 3-4. – P. 461-469.

4. Kassanis B. Potato aucuba mosaic virus /Kassanis B., Govier D.A. //C.M.I. /A.A.V /Descriptions of plant viruses. – 1972. – № 98. – P. 4.

5. Рейфман В.Г. Возбудители вирусных болезней картофеля на Дальнем востоке /Рейфман В.Г., Крылов А.В., Степаненко В.И., Костин В.Д. //Вирусные болезни с.-х. растений Дальнего востока. – Владивосток, 1971. – Т. 4. – С. 31-49.

6. Пархоменко Н.И. Изучение F-вируса на Украине /Пархоменко Н.И. //Микробиология и научно-технический прогресс. – К.: Наук. думка, 1983. – С. 115.

7. Сапоцкий М.В. Выделение F-вируса картофеля и некоторые свойства его структурного белка /Сапоцкий М.В. //Вирусные болезни растений и меры борьбы с ними. – Владивосток, 1980. – С. 50-58.

8. Maat D.Z. Potato aucuba mosaic virus purification, preparation of antisera and testing of greenhouse-growing potato plants /Maat D.Z. //Potato Res. – 1973. – Vol. 16, № 4. – P. 302-305.

9. Juo P.S. Purification of potato aucuba mosaic virus /Juo P.S., Rich A.E. //Phytopatol. – 1969. – Vol. 59, № 11. – P. 1816-1819.

10. Новиков В.К. Метод получения препарата Y-вируса картофеля и приготовление диагностических антисывороток /Новиков В.К., Атабеков И.Г., Агур М.О. и др. //С.-х. биология. – 1982. – Т. 17, № 5. – С. 706-711.

11. Пат. 64377А Україна, МПК⁷ С 12 N 7/00. Пристрій для препаративного електрофорезу в гранульованому середовищі /О.Є. Мамчур, О.О. Дмитрук, М.М. Зарицький. – заявл. 22.05.2003; опубл. 16.02.2004, Бюл. № 2.

12. Мамчур О.Є. Метод отримання очищених препаратів вірусів рослин /Мамчур О.Є., Дмитрук О.О., Коломієць Л.П., Зарицький М.М. //С.-г. мікробіол.: міжвід. темат. наук. зб. – Чернігів: ЦНТЕІ, 2005. – Вип. 1-2. – С. 165-170.

13. Гааль Э. Электрофорез в разделении биологических макромолекул /Э. Гааль, Г. Медвеша, Л. Верецкеи. – М.: Мир, 1982. – С. 50-52.

**ПОЛУЧЕНИЕ ПРЕПАРАТОВ ВИРУСА АУКУБА
МОЗАИКИ КАРТОФЕЛЯ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА
ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ СЫВОРОТКИ И
ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ**

Дмитрук О.А., Мамчур А.Е., Коломиец Л.П.

Институт сельскохозяйственной микробиологии УААН, г. Чернигов

Разработаны эффективные методы получения препаратов вируса аукуба мозаики картофеля (ВАМК) с высокой степенью чистоты и повышенным выходом вируса (до 280 мг/кг), который могут быть использованы для изготовления антигена ВАМК при производстве специфических антисывороток и проведении иммунохимических реакций.

Ключевые слова: вирус аукуба мозаики картофеля, очистка и концентрирование вируса

**THE RECEPTION OF POTATO AUKUBA MOSAIC
VIRUS PREPARATIONS FOR THE PRODUCTION
OF DIAGNOSTIC SERUMS AND IMMUNOLOGICAL
STUDIES**

Dmitruk O.A., Mamchur A.E., Kolomiets L.P.

Institute of Agriculture Microbiology, UAAS, Chernihiv

The efficient methods for the reception of potato aucuba mosaic virus preparations with high purity degree and the increased virus output (up to 280 mg/kg) were elaborated. They can be used for antigen production for the specific antiserums and conducting of immunochemical reactions.

Key words: potato aucuba mosaic virus, purification and concentration of virus.