

ОСОБЛИВОСТІ ІМУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛІЗУ РОСЛИН КАРТОПЛІ КУЛЬТУРИ *IN VITRO*

Волкова І.В., Коломієць Л.П.

Інститут сільськогосподарської мікробіології УААН
вул. Шевченка, 97, м. Чернігів, Україна, 14027

Проведення імуноферментного аналізу рослин культури in vitro ускладнено особливостями фізіологічного статусу рослин та особливостями інфекційного процесу внаслідок застосування активної терапії. Нами адаптовано використання пероксидазних імуноферментних діагностикумів, сконструйованих з використанням препаратів “виснажених” антитіл, для вірусологічного аналізу пробіркових рослин картоплі.

Встановлена необхідність при негативному результаті ТІФА застосовувати додатковий електронномікроскопічний контроль зразків картоплі культури in vitro через можливість значного зниження концентрації вірусу внаслідок застосування активної терапії, а також проведення аналізу після стабілізації фізіологічного статусу рослин шляхом вирощування їх у відкритому ґрунті або оптимізації температурного режиму, фотоперіоду та газообміну в умовах пробірки.

Ключові слова: рослини картоплі культури in vitro, твердофазовий імуноферментний аналіз (ТІФА), “виснажені” антитіла.

Виробництво високоякісного насінневого матеріалу є основою галузі картоплярства і має забезпечувати найбільш повну реалізацію генетично визначеного потенціалу сортів. Метод культури апікальних меристем для звільнення рослин від вірусів широко використовується як складова частина системи первинного насінництва картоплі.

Важливим елементом на всіх етапах оздоровлення та відтворення оздоровленого насінневого матеріалу є контроль його якості з використанням комплексу методів. У практиці насінництва картоплі широкого застосування набув імуноферментний аналіз завдяки високій чутливості (10-15 –55 нг/мл, залежно від модифікації) та специфічності.

Рівень чутливості ІФА дозволяє діагностувати віруси в рослинному матеріалі з високим ступенем надійності. Проте розробка методу ІФА для кожного конкретного збудника потребує досліджень, спрямованих на оптимізацію умов відбору проб, підготовки зразків та проведення аналізів – емпіричний підхід необхідний для кожної системи вірус – рослина [1].

Рослини картоплі культури *in vitro* відрізняються фізіологічними особливостями, які ускладнюють вірусологічний контроль матеріалу. В

процесі оздоровлення картоплі методами активної терапії не завжди досягається повне звільнення від інфекції, може відбуватись елімінація чи зниження концентрації вірусу до рівня, нижчого за межу чутливості методів діагностики [2-4]. Крім того, фізіологічна адаптація рослин пробіркової культури до умов вирощування включає активний синтез білків і ферментів, як реакцію на біологічно активні компоненти поживних середовищ, температуру, світловий режим [5]. Одним із функціонально лабільних ферментів є пероксидаза: спостерігається значне збільшення активності ферменту та зміни ізoferментних форм за умов водного дефіциту, механічних пошкоджень, при старінні рослин, патогенезі та дії високої температури тощо [5, 6]. Стресові білки активно синтезуються рослинами культури *in vitro* та неспецифічно зв'язуються із сироватковими антитілами незалежно від специфічності останніх, що дає хибнопозитивні реакції при серологічному аналізі цього матеріалу [7].

Метою наших досліджень було визначити умови проведення вірусологічного контролю рослин картоплі культури *in vitro*.

Матеріали і методи. Дослідження проводили на оздоровлених та інфікованих Х-вірусом рослинах картоплі культури *in vitro*, які вирощували в умовах люміностау при фотоперіоді в 16 годин та температурі 18-22 °С.

Для контролю пробіркових рослин використовували електронну мікроскопію нативних препаратів листків, контрастованих ФВК, та твердофазовий імуноферментний аналіз (“сендвіч”-варіант).

Препарати ХВК для імунізації тварин отримували з листя рослини-накопичувача вірусу *Datura stramonium L.* Заморожене листя гомогенізували з одним об'ємом 0,05М цитратного буфера, рН 9,0; екстракт освітлювали хлороформом (1:7), хроматографували на колонці з молселектом Г-50 та рехроматографували на колонці з ДЕАЕ-50. Концентрацію вірусного білка та його чистоту визначали за допомогою спектрофотометра СФ-46. Антиген у відібраних фракціях концентрували поліетиленгліколем (м.в. 6000) та ресуспендували у фізіологічному розчині.

Гіперімунну кролячу антисироватку отримували після імунізації тварин препаратами ХВК з ад'ювантом мантанид ISA N 206 у співвідношенні 1:1 (маса/маса) за розробленою нами схемою з використанням мікродоз. Імунізація передбачала 4 ін'єкції по 0,2 мг вірусного антигену з чергуванням підшкірних та внутрішньошкірних (8-10 місць вздовж хребта) введень. Після першої імунізації інтервал становив тиждень, після другої – два дні. Через тиждень після останньої імунізації відбирали кров та визначали титр сироватки крапельним методом.

Для отримання очищених препаратів імуноглобулінів класу G попередньо проводили триразове висолювання гаммаглобулінової фракції антивірусної сироватки насиченим (66 %) розчином сульфату амонію [8, 9]. Після останнього центрифугування при 3000 об/хв протягом 20 хвилин осад ресуспендували у 0,01M Na-фосфатному буфері (рН 7,4) та діалізували при 4°C протягом ночі проти цього ж буфера. Після діалізу та центрифугування (2500 об/хв, 15 хвилин) розчин імуноглобулінів використовували для одержання препаратів стандартних та “виснажених” антитіл з використанням хроматографії на ДЕАЕ-целюлозі. Якість “виснажених” препаратів імуноглобулінів визначали за допомогою методу імунодифузії в 0,8 %-ному агарозному гелі на забуференому фізрозчині з рН 7,4. В центральну лунку вносили препарат в розведенні 1:4, в крайові - препарат білків пробіркових рослин картоплі в розведеннях 1:2, 1:4, 1:8, 1:16. Препарат антитіл вважався повністю виснаженим за умови відсутності ліній преципітації.

Отримані фракції антитіл аналізували методом твердофазового імуноферментного аналізу (ТІФА). Концентрацію білка в препаратах визначали за допомогою спектрофотометра СФ-46 за формулою Калькара: $C = 1,45 A_{280} - 0,74$ (мг/мл), де A_{280} – оптична густина при 280 нм, A_{260} – оптична густина при 260 нм.

Кон’югацію антитіл з пероксидазою хрому проводили методом періодатного окислення. Отриманий розчин кон’югату стабілізували шляхом додавання бичачого сироваткового альбуміну (10 мг/мл). Імуноферментні тест-системи конструювали у відповідності з відомими [8, 10, 11] та модифікованими нами методиками. ТІФА проводили за стандартною методикою [11] на полістиролових планшетах фірми Sarstedt (США). Для сенсibiliзації лунок планшету використовували препарат вірусоспецифічних імуноглобулінів у концентрації 10 мкг/мл в 0,05 M карбонат-бікарбонатному буфері, рН 9,6 протягом 12-18 годин при 4°C у робочому об’ємі 100 мкл. Ферментативну активність виявляли за допомогою ортофенілендіаміну (ОФД) спектрофотометрично за величиною оптичної густини (ОГ) при довжині хвилі 492 нм.

Умови проведення ТІФА передбачали порівняння співвідношення оптичної густини позитивного контролю до оптичної густини негативного контролю. Показник свідчить про наявність вірусного антигену в дослідному матеріалі, якщо його значення перевищує 2 [12].

Результати та їх обговорення. При проведенні ТІФА з використанням стандартних імунореагентів здорових за результатами електронномікроскопічного тестування рослин картоплі *in vitro* не вдалося вста-

новити достовірність аналізу внаслідок високого рівня неспецифічного зв'язування з боку покривних антитіл. Слід відмітити, що при ТІФА уражених ХВК рослин фонові реакції не спостерігали. Тобто, вірусне ураження суттєво впливає на фізіологічний стан рослин пробіркової культури, можливо, підвищуючи рівень їх адаптації до стресових чинників.

Попередньо для оптимізації умов імуноферментного аналізу рослин картоплі культури *in vitro* випробували варіанти:

- нормалізації фізіологічного статусу шляхом витримки пробіркових рослин протягом 2-3 діб в прохолодному приміщенні (за температури 18-22°C) з природним фотоперіодом та газообміном;

- зменшення неспецифічного зв'язування з боку покривних антитіл за допомогою різних реагентів при постановці реакції (Ig G нормальної сироватки кроля в концентрації 5, 20 та 30 мкг/мл, об'єм/об'єм; розчин БСА в концентрації 50 та 100 мкг/мл, об'єм/ об'єм).

Результати показали, що спроби оптимізації процесу ІФА шляхом змін означених параметрів при аналізі пробіркових рослин не дали бажаного ефекту: не вдалося знизити рівень фонові реакції. Підвищення надійності виявлення вірусів отримали при стабілізації фізіологічного та біохімічного статусу пробіркових рослин, що відбувається за умов вирощування їх у відкритому ґрунті.

Беручи до уваги дані літератури [7] щодо зменшення інтенсивності неспецифічної реакції шляхом додавання соку здорової рослини на ключових етапах проведення реакції, ми поставили собі за мету одержати біологічні компоненти, використовуючи методи виснаження антивірусних сироваток, дослідити їх імунохімічні властивості, сконструювати на їх основі імуноферментний діагностикум для виявлення фітовірусів картоплі культури *in vitro*.

З метою виснаження антисироватки отримували препарат білків із соку рослин картоплі культури *in vitro* шляхом концентрування поліетиленгліколем (м.в. 6000) після попереднього освітлення хлороформом.

Для отримання очищених препаратів “виснажених” антивірусних імуноглобулінів використовували специфічну сироватку з титром в реакції крапельної аглютинації 1:8192. Розчин імуноглобулінів, виділених за наведеною методикою, після діалізу та центрифугування (2500 об/хв, 15 хвилин) ділили на дві рівні частини та використовували для одержання стандартних та “виснажених” препаратів антитіл з використанням хроматографії на ДЕАЕ -целюлозі.

Виснаження препарату антитіл проводили за наступною схемою: інкубували при 4 °С протягом ночі препарат імуноглобулінів з пре-

паратом білків пробіркової картоплі у співвідношенні 2:1 (об'єм/об'єм); центрифугували препарат при 3000 об/хв протягом 15 хвилин; осад відкидали, а рідину хроматографували на колонці з ДЕАЕ-целюлозою 0,01М Na-фосфатним буфером (рН 7,4); відбирали фракції, які містять перший білковий пік.

В отриманих препаратах стандартних та “виснажених” імуноглобулінів паралельно визначали концентрацію білка та наявність перехресних реакцій з концентрованим препаратом білків пробіркової картоплі в реакції імунодифузії. Як показали результати наших аналізів (табл.1), виснаження антивірусної сироватки веде до значного зниження концентрації антитіл, але супроводжується підвищенням специфічності, оскільки найбільш реактивні по відношенню до стресових білків імуноглобуліни виключаються з препаратів антитіл.

Таблиця 1. Вихід білка та наявність перехресних серологічних реакцій в препаратах імуноглобулінів

Досліджувані препарати	Вихід білка, мг	Наявність перехресних реакцій з рослинними білками, розведення 1:4
Стандартні антитіла	9,63	+
“Виснажені” антитіла	5,53	-

Результати дослідження біологічних реагентів, отриманих методом ТІФА, наведені в табл. 2 та 3. Досліджувані фракції імуноглобулінів вносили в лунки в однаковій концентрації – 10 мкг/мл. При проведенні ТІФА для порівняння специфічності негативним контролем слугував сік оздоровлених пробіркових рослин картоплі в розведенні 1:30, позитивним- той самий сік з доданим вірусним антигеном. При аналізі чутливості розведення соку пробіркових рослин в негативному та позитивному контролях дорівнювало 1:30, тоді як антиген ХВК брали в розведенні від 1:30 до 1:1200.

Результати порівняльного аналізу експериментальних систем ТІФА показали, що найбільшими показниками специфічності та чутливості характеризується імуноферментна система з модифікованими реагентами: знижується сигнал оптичної густини негативних зразків, значно підвищується співвідношення середніх значень оптичної густини позитивних і негативних зразків, що, в свою чергу, дозволяє достовірно виявити вірусний антиген у меншій концентрації.

Таблиця 2. Порівняльний аналіз специфічності ТІФА при виявленні антигену ХВК

Досліджувані зразки	Використання антитіл для сенсibilізації*	
	стандартні антитіла	“виснажені” антитіла
ОГ сер. (+)	2,673	2,585
ОГ сер. (-)	0,204	0,094
ОГ сер. (+)/ ОГ сер. (-)	27,57	13,10

* Концентрація білка – 10 мкг/мл

ОГ сер. (+), ОГ сер.(-) – середні значення оптичної густини позитивних та негативних зразків, відповідно;

ОГ сер. (+)/ ОГ сер. (-) – співвідношення середніх значень оптичної густини позитивних та негативних зразків.

Таким чином, результати аналізу імунохімічних властивостей препарату “виснажених” антитіл в імунодифузії та імуноферментних тестах свідчать про його переваги над стандартним реагентом і дає підстави використовувати препарати “виснажених” антитіл при конструюванні тест-систем для виявлення фітовірусів картоплі культури *in vitro*.

Встановлена ефективність пероксидазних імуноферментних діагностикумів, сконструйованих з використанням модифікованих реагентів, для контролю ураженості вірусами рослин картоплі пробіркової культури.

Таблиця 3. Порівняльний аналіз чутливості ТІФА при виявленні антигену ХВК

Досліджувані зразки	Використання антитіл для сенсibilізації*							
	стандартні антитіла				“виснажені” антитіла			
	розведення в соку антигену ХВК							
	1:30	1:120	1:560	1:1200	1:30	1:120	1:560	1:1200
ОГ сер. (+)	2,583	2,091	0,557	0,331	2,757	1,821	0,648	0,380
ОГ сер. (-)	0,221				0,343			
ОГ сер. (+) / ОГ сер. (-)	11,69	9,46	2,52	1,48	8,02	5,31	1,89	1,11

* Концентрація білка – 10 мкг/мл

ОГ сер. (+), ОГ сер.(-) – середні значення оптичної густини позитивних та негативних зразків, відповідно;

ОГ сер. (+)/ ОГ сер. (-) – співвідношення середніх значень оптичної густини позитивних та негативних зразків.

Незважаючи на підвищення достовірності виявлення вірусних антигенів при використанні оптимізованих тест-систем, обов'язковим є електронномікроскопічний контроль зразків картоплі культури *in vitro*, в яких методом ТІФА не встановлено інфікування, оскільки концентрація вірусу при застосуванні активної терапії може бути нижчою за чутливість імуноферментного аналізу.

Крім того, виходячи з особливостей взаємодії вірус – рослина, які складаються при застосуванні методів активної терапії, для підвищення надійності діагностики вірусів у пробіркових рослинах необхідно стабілізувати фізіологічний та біохімічний статус рослин, що відбувається при вирощуванні у відкритому ґрунті та оптимізацією температурного режиму, фотоперіоду та газообміну в умовах пробірки.

Проведені дослідження дозволили визначити умови проведення вірусологічного контролю рослин картоплі культури *in vitro*, ускладнені особливостями фізіологічного статусу рослин та особливостями інфекційного процесу внаслідок застосування активної терапії.

1. Dedic P. Diagnoza viru bramboru metodu ELISA v duznine sekundarne infikovanych hliz a v kliccich // Ved. Prace Vyzk. Slecht. Ustavu Brambor. v Havlickove Brode. – 1988. – 11. – S. 83-95

2. Шмыгля В.А.; Николаева О.И.; Большакова Л.В. Достоверность иммуноферментной диагностики вирусов картофеля и томата и пути ее повышения // Состояние и перспективы развития с.-х. биотехнологии. – М.:Наука, 1986. – С. 109-113.

3. Braun A.L.; Opgenorth D.C. Comparative detectability of potato leafroll virus, potato virus X and potato virus S using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and serologically specific electron microscopy (SSEM) // Am. Potato J. – 1987. – 64, N 4. – P. 205-207.

4. Різник В.С. Оздоровлення картоплі: проблеми і перспективи // Картоплярство. – 1997. – Вип. 27. – С. 23-34.

5. Бутенко Р.Г. Некоторые физиологические проблемы при культивировании *in vitro* картофеля // Регуляция роста и развития картофеля. – М.: Наука, 1990. – С. 88-98.

6. Савич И.М. Peroксидазы – стрессовые белки растений // Успехи соврем. биологии. – 1989. – 107, № 3. – С. 406-417.

7. Gunn L.V.; Pares R.D. Effect of potato physiology on the interpretation of ELISA results for potato leafroll virus // Plant Pathol. – 1988. – 37, № 4. – P. 516-521

8. Иммунологические методы: Пер. с нем./ Под ред. Г. Фримеля.

– М.: Медицина, 1987. – 472 с.

9. Кленина Н.В., Антонов В.С., Михайлова С.А. Методические рекомендации по выделению иммуноглобулинов. – Харьков, 1983. – 23 с.

10. Антитела. Методы. / Под ред. Д.Кэтти. – М.: Мир, 1991. – 384 с.

11. Clark M.F., Adams A.N. Characteristics of the micro-plate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses// J. Gen. Virol. – 1977. – 34. – P. 475-483.

12. Егоров А.М., Осипов А.П., Дзантиев Б.Б. и др. Теория и практика иммуноферментного анализа. – М.: Высшая школа, 1991. – 288 с.

УДК 578.863:632.937:635.24

ОСОБЕННОСТИ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ КУЛЬТУРЫ IN VITRO

Волкова И.В., Коломиец Л.П.

Институт сельскохозяйственной микробиологии УААН, г. Чернигов

Проведение иммуноферментного анализа растений картофеля культуры in vitro усложнено особенностями физиологического статуса растений и инфекционного процесса после применения активной терапии. Нами адаптировано использование пероксидазных иммуноферментных диагностикумов, сконструированных с использованием препаратов “истощенных” антител, для вирусологического анализа пробирочных растений картофеля.

Установлена необходимость, при негативном результате ТИФА дополнительного электронномикроскопического контроля образцов картофеля культуры in vitro из-за возможности значительного снижения концентрации вируса вследствие применения активной терапии и проведения анализа после стабилизации физиологического статуса растений выращиванием их в открытом грунте или оптимизацией температурного режима, фотопериода и газообмена в условиях пробирки.

Ключевые слова: растения картофеля in vitro, твердофазный иммуноферментный анализ (ТИФА), “истощенные” антитела.

THE PECULIARITY OF IMMUNOFERMENT ASSAY OF POTATO PLANTS IN VITRO

Volkova I.V., Kolomic L.P.

Institute of Agricultural Microbiology, UAAS, Chernihiv

Immunoferment assay (IFA) of potato plants in vitro has been limited to peculiarity of plants physiological status and property of infection process under the active therapy. Using of peroxidase immunoferment diagnosticums at the base of “exhausted” screening antibodies has been adapted for viruses analysis of test-tube potato plants.

At the negative results of IFA, plants samples must be tested by electron microscopic method for the presence of small quantities of viruses, and by IFA after normalization of plants physiological status at the field conditions or after normalization of temperature, photoperiod, gas exchange at the test tube conditions recognized as necessary.

Key words: *potato plants in vitro, immunoferment assay (IFA), “exhausted” screening antibodies.*