

ОТРИМАННЯ БІОЛОГІЧНИХ КОМПОНЕНТІВ ТЕСТ-СИСТЕМ ІФА ДЛЯ ДІАГНОСТИКИ ВІРУСУ АУКУБА МОЗАЇКИ КАРТОПЛІ (*POTATO AUCUBA MOSAIC VIRUS*)

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

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

Розроблені схеми препаративного виділення РАРV з високим виходом вірусу (до 280 мг на 1 кг листя) та виробництва діагностичних антисироваток, що уможливило одержання високоспецифічних антитіл та пероксидазного кон'югату – біологічних компонентів, необхідних для конструювання тест-системи ТІФА для виявлення вірусу аукуба мозаїки картоплі в рослинному матеріалі.

Ключові слова: вірус аукуба мозаїки картоплі, чисті препарати вірусу, антисироватка, антитіла, пероксидазний кон'югат, імуноферментний аналіз (ІФА).

Картопля належить до культур, які значною мірою уражуються хворобами. Вірусна інфекція порушує типовий перебіг обміну речовин в рослинах, що призводить до зниження продуктивності та погіршення якості продукції. Зниження втрат, спричинених хворобами і шкідниками, є одним з основних резервів підвищення врожайності та поліпшення якості не лише садивного матеріалу, а й продовольчої картоплі [1].

Контроль вірусного ураження картоплі на всіх етапах її вирощування (в процесі оздоровлення, при виробництві посадкового і насінневого матеріалу, його сертифікації, при карантинному контролі продукції, проведенні оцінки селекційних зразків) має бути забезпечений швидкими і надійними методами діагностики. Для вірусологічного аналізу рослинного матеріалу здебільшого застосовується твердофазний імуноферментний аналіз (ТІФА), який характеризується високою чутливістю та специфічністю, простотою реєстрації результатів, а також високою стабільністю реагентів [2]. Використання імуноферментних діагностикумів передбачене системою насінництва картоплі України при виробництві вихідного матеріалу та сертифікації насіння. Перелік вірусних хвороб та їх збудників, контроль яких затверджено ДСТУ 4013-2001 “Сортові та посівні якості картоплі насінневої”, включає в себе і вірус аукуба

мозаїки картоплі.

Щоб розробити методи імунодіагностики для кожного конкретного збудника необхідно знайти шляхи оптимізації умов отримання стандартизованих біологічних реагентів для конструювання тест-систем та відпрацювання умов проведення ІФА.

Вивчення вірусу аукуба мозаїки картоплі є актуальним через відсутність даних щодо розповсюдженості, шкідливості, штамового складу PAMV в умовах України, стійкості до вірусу районованих сортів.

Метою наших досліджень була розробка ефективних методів отримання біологічних реагентів для конструювання імуноферментної тест-системи, за допомогою якої можна виявити вірус аукуба мозаїки картоплі в рослинному матеріалі.

Матеріали і методи. Використовували штам PAMV, виділений з рослин картоплі сорту Обелікс.

PAMV накопичували на рослинах *Nicotiana rustica L.*, які вирощували в умовах вегетаційної камери при температурі 20-22 °С з фотоперіодом 16 годин. Заражали рослини у фазі 2-4 листків методом механічної інокуляції з попереднім обпудрюванням карборундом. Листя інфікованих рослин відбирали на 10-14-й день після інокуляції, в період максимальної концентрації вірусу.

При розробці методу очищення PAMV застосовували відомі методики [3,4] та метод препаративного електрофорезу з використанням приладу для препаративного електрофорезу [5], сконструйованого в Інституті сільськогосподарської мікробіології УААН.

Контроль отримання чистих препаратів на різних етапах проводили з використанням серології в реакції крапельної аглютинації [6] 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 22-30 тис.

Спектри поглинання УФ-світла препаратами PAMV реєстрували на однопроменевому спектрофотометрі СФ-46.

Гіперімунну кролячу сироватку одержували після імунізації тварин препаратами PAMV з ад'ювантом MONTANIDE ISA 25 (фірми "SEPPIC", Франція) за розробленою нами схемою.

Через тиждень після останньої імунізації тричі відбирали кров та визначали титр сироватки в реакції крапельної аглютинації, методами подвійної дифузії в гелі та імуноелектрофорезу в агарозному гелі [6,7].

Імуноглобуліни класу G отримували шляхом висолювання сироватки насиченим (66%) розчином сульфату амонію з використанням іонообмінної хроматографії на ДЕАЕ-целюлозі. Отримані фракції антитіл аналізували спектрофотометрично (E_{280}/E_{260}) та методом градієнтного електрофорезу в ПААГ.

Кон'югацію кролячих антитіл з пероксидазою хрому проводили методом перйодатного окислення вуглеводних груп ферменту [9]. Отриманий розчин кон'югату стабілізували шляхом додавання бичачого сироваткового альбуміну (БСА) в концентрації 10 мг/мл. Як субстрат пероксидази використовували розчин ортофенілендіаміну. Зупиняли реакцію, додаючи, 5 М НСІ. Визначення робочих характеристик одержаного кон'югату проводили в прямому варіанті ТІФА за стандартною методикою [10], результати реєстрували на ридері ІФКО-2 при довжині хвилі 492 нм.

Результати та їх обговорення. Розроблений нами метод отримання препаратів РАМV передбачає використання при екстракції трис-гліцинового буфера, рН 8,4, освітлення інфекційного екстракту тритоном X-100, переосадження вірусу поліетиленгліколем (ПЕГ) та кінцеву очистку методом препаративного електрофорезу з використанням 40%-ної сахарозної подушки. Сконцентрований шляхом осадження ПЕГ препарат РАМV нашаровували на 40%-ну сахарозну подушку, сформовану в електрофоретичній колонці. Електрофорез проводили в лужній системі буферів за температури 16-20 °С, напруги 380-400 В та сили струму 8-10 мА протягом 3 годин. Така схема дала можливість здійснювати очищення РАМV без застосування органічних розчинників для первинного освітлення соку, які різко знижують вихід вірусу. Крім того, завдяки відсутності проміжних циклів диференційного центрифугування вдалося збільшити загальний вихід вірусу до 280 мг на 1 кг листя.

Препарати РАМV, як показало електронномікроскопічне дослідження, містили типові для даного вірусу частки завдовжки 580 нм (рис. 1), а також агрегати віріонів з переважанням останніх. Залишків клітинного дебриса не виявлено. Спектр поглинання очищених препаратів мав характерний максимум при довжині хвилі 265 нм, мінімум – при 247 нм. Величина співвідношення E_{260}/E_{280}

становила 1,1, що можна пояснити підвищеним ступенем агрегації вірусних часток та величиною світлорозсіювання в препаратах при довжині хвиль 320-350 нм.

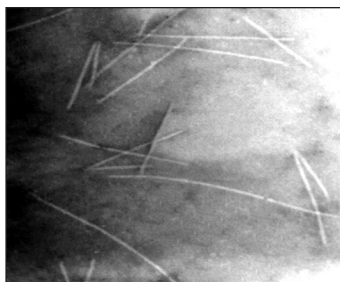


Рис. 1. Електроннограма очищеного препарату РАМВ (x 30000)

Отриманий препарат РАМВ використовували для проведення електронномікроскопічних та спектрофотометричних досліджень і як антиген для імунізації кролів.

Подальшим етапом роботи було одержання за розробленою нами схемою (табл.1) діагностичної антисироватки до РАМВ.

Таблиця 1. Схема імунізації кролів для отримання антисироватки до РАМВ

День циклу імунізації	Спосіб введення антигену	Кількість АГ, мл	Концентрація АГ, мг/мл
1	підшкірно з ад'ювантом ISA-25	1,5	1
7	внутрішньовенно	2,0	2
9	підшкірно	1,5	1
11	внутрішньошкірно	1,5	1
38	внутрішньом'язово	1,5	2
45	внутрішньом'язово з повним ад'ювантом Фрейнда	4	1
48	внутрішньовенно	2	2

Через тиждень після останньої імунізації тричі відбирали кров та визначали титр сироватки. Діагностична сироватка давала реакцію крапельної аглютинації з інфікованим РАМВ рослинним матеріалом при максимальному розведенні 1:2048. Титр отриманої сироватки в реакції подвійної дифузії в гелі становив 1:128, в осмоелектроімунофорезі в агарозному гелі – 1:4096 (рис. 2).

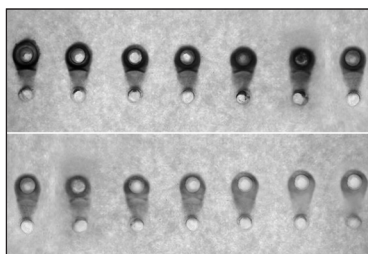


Рис. 2. Результати титрування антисироватки до PAMV методом осмоелектроімунофорезу в 1%-ному агарозному гелі

Отримана антисироватка специфічна і не вступає в реакцію з екстрактами із здорових рослин-накопичувачів (*Nicotiana rustica* L.), картоплі і тест-рослин, інфікованих ХВК, SBK, MBK, YBK, ВТМ.

Одну частину отриманої сироватки використовували в реакції крапельної аглютинації, другу – для одержання антивірусних імуноглобулінів.

Для конструювання будь-якої системи ТІФА (в нашому випадку сендвіч-комплексу антитіло-антиген-антитілофермент), необхідно одержати біологічні реагенти, насамперед, високо-специфічні антитіла та кон'югат.

Чистоту поліклональних антивірусних антитіл, одержаних шляхом висолювання сироватки насиченим (66%) розчином сульфату амонію з використанням іонообмінної хроматографії на ДЕАЕ-целюлозі перевіряли методом градієнтного електрофорезу в ПААГ (рис. 3). Електрофореграма отриманих препаратів імуноглобулінів G відображає високий ступінь очищення (рис.3, варіант 3).

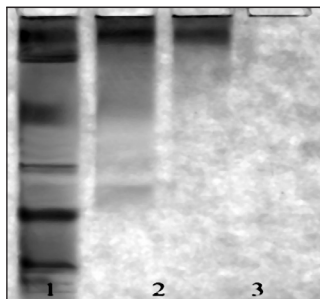


Рис. 3. Електрофореграма очищених препаратів імуноглобулінів G, отриманих методом висолювання сульфатом амонію

1 – препарат нативної сироватки, розведеної 1:20;
2 – препарат Ig G після осадження 66%-ним сульфатом амонію;
3 – фракція Ig G після гельфільтрації на ДЕАЕ-целюлозі

Електрофоретичний та спектрофотометричний аналіз імуноглобулінових фракцій показав, що отриманий препарат Ig G достатньо очищений ($D_{260/280} = 1,1$) і може використовуватись як покривні антитіла для сенсibiliзації планшетів та для кон'югації з пероксидазою хрону.

За літературними даними, при виробництві наборів ТІФА для визначення вірусів картоплі допустиме використання як лужної фосфатази, так і пероксидази хрону [11]. Одержаний нами пероксидазний кон'югат перевіряли в прямому варіанті ТІФА. Позитивним контролем для визначення титру та робочого розведення кон'югату був очищений препарат вірусу аукуба мозаїки картоплі, негативним контролем – Х-вірус картоплі. Для визначення специфічності і рівня фонових реакцій одержаний кон'югат перевіряли в прямому варіанті ТІФА з використанням БСА (рис. 4).

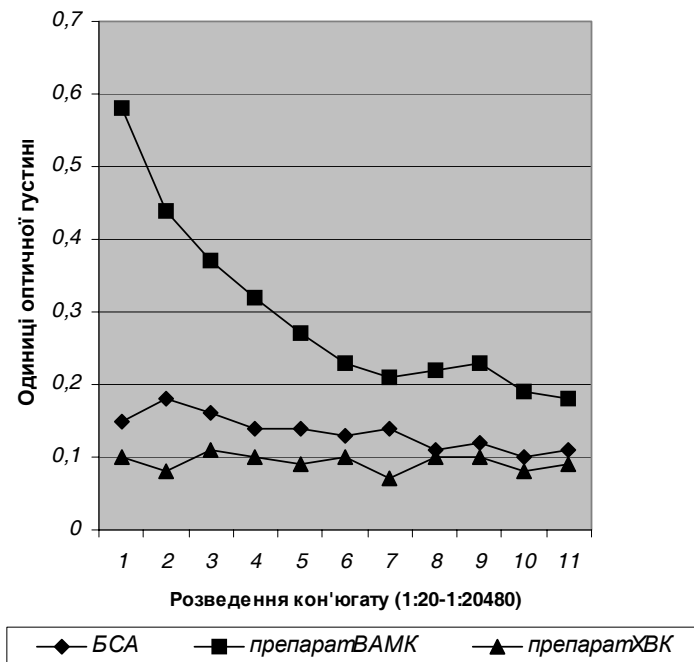


Рис. 4 Результати титрування пероксидазного кон'югату в прямому варіанті ТІФА.

Встановлено, що рівень фонові реакції в контрольних

лунках (покрытих БСА) є незначним. Позитивна реакція в лунках з антигеном чітко відрізняється забарвленням реагентів. Титр кон'югату становить 1:25600, робоче розведення – 1: 1600.

Таким чином, нами розроблено схеми препаративного виділення РМВ з високим виходом вірусу, а також виробництва діагностичних антисироваток, що дає можливість одержувати високоспецифічні антитіла та пероксидазний кон'югат – біологічні компоненти, необхідні для конструювання тест-системи ТІФА для виявлення вірусу аукуба мозаїки картоплі в рослинному матеріалі.

1. Теслюк П.С., Полоцький М.Я., Власенко М.Ю. Насінництво картоплі. – Біла Церква.: Білоцерківський держ. аграр. ун-т, 2000. – С. 137-156.

2. Гнutowa P.B. Иммунологические исследования в фитовирусологии. – М.: Наука, 1985. – 182 с.

3. Сапоцкий М.В. Выделение F-вируса картофеля и некоторые свойства его структурного белка // Вирусные болезни растений и меры борьбы с ними: Материалы VII Всесоюзного совещания по вирусным болезням растений. – Владивосток: ДВНЦ АН СССР, 1980. – С. 50-58.

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

5. 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.

6. Дунин М.С., Попова Н.М. Капельный метод анализа в растениеводстве. – М.: Сельхозгиз. – 1973. – 45 с.

7. Ouchterlony O. Diffusion-in-gel methods for immunological analysis // Prog. Allergy. – 1962. – № 6. – P. 3-15.

8. Иммунологические методы /Под ред. Г. Фримеля; Пер. с нем. – М.: Медицина, 1987. – 472 с.

9. Nakane P.K., Kawaoi A. Peroxidase labeled antibody. A new method conjugation //Ibid. – 1974. – Vol. 22, № 10. – P. 1084-1091.

10. Кэтти Д., Райкундалиа Ч. Иммуноферментный анализ // Антитела. Методы. / Под ред. Д. Кэтти; Пер. с англ. – М.: Мир, 1991. – Т. 2. – С. 153-239.

11. Дашкевич В.К., Радкович Е.В., Гуца Г.Н. Оптимизация методики проведения иммуноферментного анализа на основе реагентов собственного производства по определению вирусов картофеля // Актуальные проблемы защиты картофеля, плодовых и овощных культур от болезней, вредителей и сорняков. Матер. междунар. конф. (Самохваловичи, 9-12 августа 2005 г.): Тез. докл. – Минск, 2005. – С. 54-60.

**ПОЛУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ КОМПОНЕНТОВ
ТЕСТ-СИТЕМ ИФА ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ВИРУСА
АУКУБА МОЗАИКИ КАРТОФЕЛЯ (*POTATO AUCUBA
MOSAIC VIRUS*)**

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

Институт сельскохозяйственной микробиологии УААН, г. Чернигов

Разработаны схемы препаративного выделения PAMV с высоким выходом вируса (до 280 мг на 1 кг листьев) и производства диагностических антисывороток, что позволяет получать высокоспецифичные антитела и пероксидазный конъюгат - биологические компоненты, необходимые для конструирования тест-системы ИФА для выявления вируса аукуба мозаики картофеля в растительном материале.

Ключевые слова: вирус аукуба мозаики картофеля, чистые препараты вируса, антисыворотка, антитела, пероксидазный конъюгат, иммуноферментный анализ (ИФА).

**OBTAINING OF THE BIOLOGICAL COMPONENTS FOR
POTATO AUCUBA MOSAIC VIRUS IMMUNOFERMENT
TEST-SYSTEMS PRODUCTION**

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

Institute of Agricultural Microbiology, UAAS, Chernihiv

The schemes for the purified PAMV preparation obtaining with high virus exit (to 280 mg/kg of plant leaves) and for the antiserum production have been worked out, that gave the possibility of the high specific antibodies and active peroxidase conjugate (as the biological components for potato aucuba mosaic virus immunoferment test-systems production) obtaining.

Key words: potato aucuba mosaic virus, purified virus preparation, antiserum, antibodies, peroxidase conjugate, immunoferment assay (IFA).