

**ІМУНОФЕРМЕНТНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ  
ІНДОЛІЛОЦТОВОЇ КИСЛОТИ В КУЛЬТУРАЛЬНІЙ  
РІДИНІ МІКРООРГАНІЗМІВ****Дімова С.Б., Дмитрук О.О., Мамчур О.С.,  
Коломієць Л.П., Волкогон В.В.**

Інститут сільськогосподарської мікробіології УААН,  
вул. Шевченка, 97, м. Чернігів, 14027, Україна  
E-mail: rifam@ukrpost.ua

*Отримано специфічну антисироватку до кон'югату  $\beta$ -індоліл-3-оцтової кислоти (ІОК) з бичачим сироватковим альбуміном, яку використано для визначення вмісту ІОК у культуральній рідині мікроорганізмів конкурентним методом ІФА із застосуванням антикरोлячих імуноглобулінів, мічених пероксидазою. Розроблена імуноферментна тест-система для кількісного визначення ІОК у культуральній рідині мікроорганізмів є зручною і надійною для проведення досліджень.*

*Ключові слова: фітогормони, індолілоцтова кислота, твердофазний імуноферментний аналіз.*

На сьогодні вже не викликає сумніву той факт, що у процесі формування мікробно-рослинних симбіозів та асоціацій безпосередню участь приймають ауксини, зокрема,  $\beta$ -індоліл-3-оцтова кислота, яка впливає як на ступінь прояву первинних молекулярних сигналів між рослиною і мікроорганізмами [1], так і на регулювання активності процесів симбіотичної та асоціативної азотфіксації [2-6]. У зв'язку з тим, що дія фітогормонів на ріст і розвиток рослин залежить від їх концентрації, актуальними є дослідження з визначення оптимального навантаження цих речовин на рослину і регулювання їх вмісту в мікробних препаратах, що, у свою чергу, потребує розробки ефективних методів визначення якісного та кількісного складу фітогормонів у культуральній рідині мікроорганізмів-біоагентів препаратів.

Традиційні методи визначення ІОК (біотестування та фізико-хімічні) відзначаються трудоемністю та тривалістю проведення аналізів. Вимогам експрес-аналізу значною мірою відповідають імуноферментні методи [7], які не потребують тривалого очищення

зразків перед аналізом, без чого неможливе, наприклад, будь-яке фізико-хімічне дослідження.

Для визначення вмісту ІОК у рослинах розроблено методику конкурентного твердофазового імуноферментного аналізу [8]. Метою наших досліджень була розробка тест-системи на основі твердофазного конкурентного ІФА для визначення кількісного вмісту ІОК у культуральній рідині мікроорганізмів.

**Матеріали і методи.** У роботі використано культуральну рідину бактерій – представників видів *Azospirillum brasilense* (штами 410, Sp-7, Д-1, Д-5), *Azospirillum lipoferum* (штами 4014, С-1), *Bradyrhizobium japonicum* (М-8, 6346) та *Pseudomonas sp.* з Колекції корисних ґрунтових мікроорганізмів Інституту сільськогосподарської мікробіології УААН. Мікроорганізми культивували на рідких поживних середовищах при температурі 28 °С протягом 72 годин. Для бактерій роду *Azospirillum* використовували середовище, рекомендоване для азоспірил [9], для бульбочкових бактерій – люпинове середовище [10], для псевдомонад – середовище Муромцева [11].

Очищення культуральної рідини мікроорганізмів для імуноферментного аналізу проводили перед тестуванням. Суспензію звільняли від бактеріальних клітин центрифугуванням протягом 10 хв при 8 тис. об./хв, використовували супернатант без додаткового очищення.

При проведенні досліджень готували стандартизовані розчини ІОК з концентрацією від 1 до 32 мкг/мл.

Для кон'югації фітогормону з білком використовували карбодіімідний метод, згідно якого зшиваючим агентом для отримання кон'югату є похідна карбодііміду – дициклогексилкарбодіімід. Для ковалентного зв'язування ІОК з бичачим сироватковим альбуміном (БСА) або овальбуміном (ОА) 50 мг ІОК розчиняли в 1 мл безводного діоксану, який завчасно обезводжували за використання металічного натрію [8]. До розчиненої в діоксані ІОК додавали 50 мг дициклогексилкарбодііміду, розчин перемішували протягом 30 хвилин за кімнатної температури та центрифугували при 8 тис. об./хв протягом 10 хв. Супернатант краплями, перемішуючи, додавали до 10 мл 0,1 М боратного буфера рН 8,5, що містив 100 мг БСА або ОА. Для кон'югації суміш залишали на ніч при температурі +4 °С. Отриманий препарат кон'югату очищували від незв'язаної ІОК діалізом проти 0,1 М боратного буфера рН 8,5,

розливали порціями по 0,5 мл та зберігали в морозильній камері при температурі  $-20^{\circ}\text{C}$ . Контроль якості отриманого кон'югату здійснювали спектрофотометричним методом.

Антисироватки до ІОК одержували шляхом імунізації дослідних тварин (японських перепелів та кролів) кон'югатом ІОК+БСА за рекомендованою [9] та розробленими схемами. Через тиждень після останньої імунізації тварин тричі відбирали кров та аналізували сироватку методом простої дифузії за Уденом [10].

При проведенні конкурентного імуноферментного аналізу для сенсibiliзації полістиролових планшетів застосовували кон'югат ІОК+ОА у робочому розведенні в 0,05 М карбонатному буфері рН 9,5, який вносили у лунки по 0,1 мл, інкубували 16-18 годин при  $4^{\circ}\text{C}$ . По закінченні етапу адсорбції, як і на всіх наступних етапах, лунки планшетів тричі промивали фізіологічним розчином, що містив 0,05 % твіну-20. Для зменшення фонового рівня реакції використовували блокування вільних сайтів (де не відбулась адсорбція кон'югату ІОК+ОА) лунок полістиролового планшету додаванням яєчного альбуміну: розчин білка (10 мг/мл) інкубували у лунках панелей по 0,1 мл протягом 60 хв при температурі  $37^{\circ}\text{C}$ .

Антисироватку окремо (у планшеті для титрування) інкубували з культуральною рідиною або стандартними розчинами фітогормону: вносили по 0,05 мл імунної кролячої сироватки (робоче розведення 1:100) і проби. При цьому частина антитіл зв'язувалася з ІОК зразка, у результаті чого кількість антитіл, здатних імуносорбуватися на іммобілізованій на полістироловому планшеті ІОК, зменшувалася, що давало змогу підвищити достовірність кількісного обліку результатів аналізу. Після інкубації протягом 60 хв при  $37^{\circ}\text{C}$  проби вносили по 0,05 мл у лунки полістиролового планшету, сенсibiliзовані кон'югатом ІОК+ОА та витримували 60 хв при  $37^{\circ}\text{C}$ .

Після промивання планшетів додавали мічені пероксидазою хрому козячі антикролячі антитіла («Sigma», США). Інкубацію проводили за температури  $37^{\circ}\text{C}$  протягом 60 хв. Ферментативну активність виявляли за допомогою субстрату (4 мг ортофенілендіаміну розчиняли в 10 мл 0,06 М фосфатного буферу рН 5,0 та додавали 0,05 мл 3 %-го розчину  $\text{H}_2\text{O}_2$ ), інкубували у темряві. Результати реакції реєстрували спектрофотометрично при довжині хвилі 490 нм.

**Результати та їх обговорення.** Оскільки ІОК є гаптенем, тобто неповноцінним одновалентним антигеном, введення його в організм тварин не викликає імунної відповіді. Імуногенних властивостей гаптени набувають тільки після кон'югації з високомолекулярними носіями. Тому першочерговим завданням у ході розробки методу ІФА для визначення вмісту ІОК у культуральній рідині мікроорганізмів було одержання імуноспецифічних реагентів – кон'югатів ІОК з овальбуміном і бичачим сироватковим альбуміном.

Кон'югат ІОК з білком отримували ковалентним зв'язуванням, яке відбувається, завдяки наявності карбоксильної групи у ІОК та аміногрупи у білка. Концентрація білка у кон'югаті за даними спектрофотометричного аналізу дорівнювала 2 мг/мл.

Препарати ІОК+БСА в подальшому були використані для імунізації дослідних тварин і отримання імунних антисироваток, ІОК+ОА – для сенсibilізації планшетів при проведенні ТІФА.

Імунізацію перепелів проводили без використання ад'ювантів за двома схемами. За першою внутрішньом'язово вводили по 0,2 мл кон'югату ІОК+БСА (концентрація білка становила 1 мг/мл) з інтервалом між ін'єкціями один тиждень протягом трьох місяців. За другою, скороченою схемою, імунізацію проводили протягом двох тижнів: внутрішньом'язово вводили поступово зростаючу дозу антигену від 0,5 до 0,8 мл з концентрацією білка 1 мг/мл (табл. 1). Відбір крові при декапітації проводили через 7 днів після останньої імунізації з використанням як антикоагуляційної речовини 5 %-ного розчину цитрату натрію.

*Таблиця 1. Схема імунізації японських перепелів*

Дні імунізації	Об'єм антигену (ІОК+БСА), мл	Концентрація білка в антигені, мг/мл
1-й	0,5	1
7-й	0,6	1
11-й	0,7	1
13-й	0,8	1

У дослідях, проведених з перепелами, встановлено можливість використання для імунізації тварин при отриманні антисироватки до синтезованого антигену (кон'югату ІОК+БСА) разової дози введення антигену 0,8-1,0 мл за концентрації білка

1 мг/мл у боратному буферному розчині рН 8,5.

При отриманні антисироваток з використанням кролів застосували іншу схему імунізації: тваринам внутрішньом'язово вводили 1 мл кон'югату ІОК+БСА (концентрація білка в препаратах 1-2 мг/мл) у суміші з 0,5 мл повного ад'юванта Фрейнда («Sigma», США); повторні ін'єкції антигену у тій же дозі, змішаного з 0,5 мл неповного ад'юванта Фрейнда («Sigma», США), здійснювали з інтервалом 2 тижні протягом трьох місяців (табл. 2). Відбір крові кролів проводили через 7-10-12 днів після останньої імунізації.

*Таблиця 2. Схема імунізації кролів*

Дні імунізації	Об'єм антигену (ІОК+БСА), мл	Концентрація білка в антигені, мг/мл
1-й	1	1
14-й, 28-й, 42-й, 56-й, 70-й, 84-й	1	1-2

При визначенні специфічності методом простої лінійної імунодифузії за Уденом отримана антисироватка до ІОК утворювала лінію преципітації лише з гомологічним антигеном (ІОК+БСА).

Методику проведення ІФА відпрацьовували, використовуючи розчини ІОК з відомою концентрацією. Застосували конкурентний варіант ТІФА: кон'югат ІОК+ОА адсорбували на твердій фазі – оптично прозорому полістиролі.

Сенсибілізацію полістиролових плат покривним кон'югатом ІОК+ОА здійснювали розчином кон'югату в дистильованій воді у співвідношенні 1:10 за використання 2 %-го розчину глутарового альдегіду. При застосуванні глутаральдегіду значно підвищується ефективність зв'язування білків з платою за рахунок ковалентних зв'язків, порівняно зі звичайною адсорбцією, яка відбувається за рахунок слабких електростатичних взаємодій [12]. Інкубацію плат проводили протягом 2-х годин за температури 18-22 °С, після чого плати тричі промивали дистильованою водою.

Окрім того, використання глутарового альдегіду як «зшиваючого» агента дає можливість повторного використання планшетів без проведення їх сенсибілізації покривним кон'югатом. Для повторного використання планшетів після проведення аналізу лунки заповнювали стоп-розчином 0,05 М гліцин – НСІ рН 2,8 на 20 хвилин та ретельно промивали. В наших дослідах одну плату

повторно використовували для аналізу культуральної рідини мікроорганізмів на вміст ІОК до трьох разів.

Застосований нами варіант ТІФА базується на конкуренції за антитіла між гормоном, кон'югованим з білком, який сорбований на полістиролі, і вільним ІОК стандартного розчину або аналізованого зразка. Кількість антитіл, сорбованих на полістиролі, визначали за допомогою козячих антитіл проти імуноглобулінів кроля, мічених пероксидазою хрому, які, приєднуючись до утворених на твердій фазі імунних комплексів, сприяють їх виявленню в результаті реакції ферменту з субстратом. Після досягнення оптимального рівня забарвлення через 20 хвилин ферментативну реакцію зупиняли, використовуючи стоп-розчин 0,05 М гліцин – HCl рН 2,8, що виявився ефективнішим за 4н розчин сірчаної кислоти.

За візуальної оцінки результатів позитивна реакція чітко відрізняється інтенсивністю забарвлення розчину від незначної фонові реакції в контрольних лунках (сенсibiliзованих ОА). Інтенсивність забарвлення вимірювали на спектрофотометрі при довжині хвилі 490 нм, що дозволяло отримати числові значення оптичної густини, за якими можна вирахувати вміст ІОК у досліджуваних зразках.

За результатами проведеного аналізу будували графіки залежності оптичної густини зразка від вмісту ІОК у розчинах з відомою концентрацією (рис. 1). Крива залежності хромоформної відповіді від логарифму концентрації ІОК мала відрізок, у якому розташована ефективна зона реакції за концентрації стандартного розчину ІОК від 1 до 16 мкг/мл.

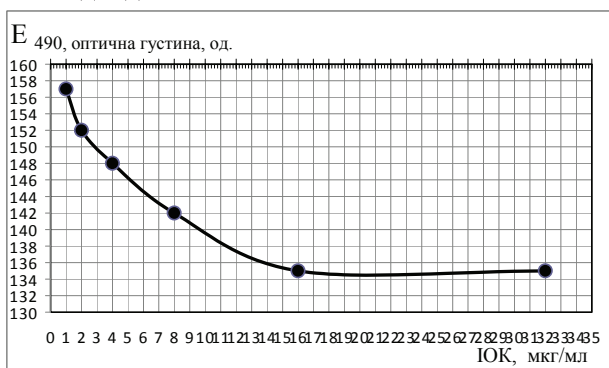


Рис. 1. Залежність оптичної густини зразка від концентрації стандартних розчинів ІОК

Вміст ІОК досліджуваного зразка культуральної рідини мікроорганізмів визначали по стандартній кривій, порівнюючи значення ОГ досліджуваного зразка з ОГ стандартного позитивного зразка відомих концентрацій. Слід зазначити, що краще проводити аналіз досліджуваного зразка в декількох розведеннях і використовувати для розрахунку вмісту фітогормону те значення ОГ, яке найближче до середини лінійного відрізка стандартної кривої.

Проведений імуноферментний аналіз культуральної рідини досліджуваних бактерій показав різну здатність мікроорганізмів до продукування ІОК (табл. 3).

**Таблиця 3. Вміст індолілоцтової кислоти в культуральній рідині мікроорганізмів**

Бактерії	ІОК, мкг/мл
<i>Azospirillum brasilense</i> 410	2,5
<i>A. brasilense</i> Sp-7	4,0
<i>A. brasilense</i> Д-1	6,0
<i>A. brasilense</i> Д-5	10,0
<i>Azospirillum lipoferum</i> 4014	9,5
<i>A. lipoferum</i> С-1	7,5
<i>Pseudomonas</i> sp.	<1
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> М-8	1,7
<i>B. japonicum</i> 634 б	5,5

Таким чином, нами отримано специфічні антисироватки до індолілоцтової кислоти та розроблено конкурентний варіант твердофазного імуноферментного аналізу, який дозволяє визначати вміст фітогормону в культуральній рідині мікроорганізмів.

Застосування розроблених методичних підходів експрес-визначення ІОК дозволить значно оперативніше проводити відбір мікроорганізмів за здатністю продукувати ауксини та розширити дослідження з оптимізації вмісту фітогормонів у мікробних препаратах.

1. Bauer P. Role of plant hormones and carbon/nitrogen metabolism in controlling nodule initiation on alfalfa roots /Bauer P., Coba De La Pena T., Frugier F. et. al. //Nitrogen Fixation: Fundamentals and Application /Ed. I.A. Tichonovich et. al. – Dordrecht/Boston/London: Kluwer Academic Publ., 1995. – P. 443-448.

2. Тагиев В.Д. Влияние гетероауксина на активность и вирулентность клубеньковых бактерий люцерны /Тагиев В.Д. //Изв. АН СССР, сер. биол. – 1965. – № 2. – С. 291-292.

3. Чайлахян М.Х. Влияние гиббереллинов и гетероауксина на рост бобовых растений и образование клубеньков /Чайлахян М.Х., Мегребян А.А., Карапетян Н.А., Каладжян Н.Л. //Изв. АН Арм. ССР. – 1967. – Т. XIV. – С. 25.

4. Волкогон В.В. Влияние фитогормонов и их синтетических аналогов на активность ассоциативной азотфиксации /Волкогон В.В., Дульнев П.Г., Ковтун Е.П. и др. //Микробиол. – 1996. – Т. 65, № 6. – С. 850-854.

5. Мальцева Н.Н. Изучение ассоциативной азотфиксации у райграса пастбищного /Мальцева Н.Н., Волкогон В.В., Гусев О.В., Дульнев П.Г. //Микробиол. журн. – 2001. – Т. 63, № 5. – С. 74-76.

6. Сальник В.П. Вплив інокуляції і регулятора росту триман-1 на активність азотфіксації, розвиток та формування симбіозу люцерни з бульбочковими бактеріями /Сальник В.П., Волкогон В.В., Мальцева Н.М., Мамчур О.Е. //Физиол. и биохим. культурн. раст. – 2001. – № 6. – С. 529-534.

7. Иммуноферментный анализ регуляторов роста растений: применение в физиологии растений и экологии /Уфа: БНЦ УрО АН СССР, 1990. – 164 с.

8. Кудоярова Г.Р. Иммуноферментное определение содержания индолилуксусной кислоты в семенах кукурузы с использованием меченых антител /Г.Р. Кудоярова, С.Ю. Веселов, М.И. Еркеев и др. //Физиол. раст. – 1986. – Т. 33, Вып. 6. – С. 1221-1227.

9. Пат. 1806123 СССР, МКИ С 05 F 11/08, С12 N1/20. Штамм бактерий *Azospirillum brasilense* для производства удобрений под райграсс пастбищный и кострец безостый /В.В. Волкогон, Н.Н. Мальцева, Л.И. Онищенко и др. – № 4916559/13; заявл. 05.03.91; опубл. 30.03.93, Бюл. № 12.

10. Тильба В.А. Аборигенная популяция ризобий сои основной соеосеющей зоны России: автореф. дис. ... д-ра биол. наук /В.А. Тильба. – Владивосток, 1998. – 46 с.

11. Муромцев Г.С. Методы изучения растворения фосфатов кальцием микроорганизмами /Г.С. Муромцев //Микробиол. – 1957. – Т. 26, Вып. 2. – С. 172-178.

12. Ehlers U. Binding of viruses from crude plant extracts to glutaraldehyde-treated plants for indirect ELISA /U. Ehlers, H.L. Paul. – J. Virol. Meth. – 1984. – Vol. 8, N 3. – P. 217-224.



## **ИММУНОФЕРМЕНТНОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ИНДОЛИЛУКСУСНОЙ КИСЛОТЫ В КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ**

**Димова С.Б., Дмитрук О.А., Мамчур А.Е.,  
Коломиец Л.П., Волкогон В.В.**

Институт сельскохозяйственной микробиологии УААН,  
г. Чернигов

*Получена специфическая антисыворотка к конъюгату  $\beta$ -индолил-3-уксусной кислоты (ИУК) с бычьим сывороточным альбумином, которая использована для определения содержания ИУК в культуральной жидкости микроорганизмов конкурентным методом ИФА с использованием антикроличьих иммуноглобулинов, меченных пероксидазой. Разработанная иммуноферментная тест-система для количественного определения ИУК в культуральной жидкости микроорганизмов является удобной и надёжной для проведения исследований.*

Ключевые слова: фитогормоны, индолилуксусная кислота, иммуноферментный анализ.

## **IMMUNE-ENZYME DETERMINATION OF INDOLILACETIC ACID IN CULTURAL LIQUIDS OF MICROORGANISMS**

**Dimova S.B., Dmitruk O.A., Mamchur A.E.,  
Kolomiets L.P., Volkogon V.V.**

Institute of Agricultural Microbiology UAAS, Chernihiv

*The antiserum specific to the conjugate of  $\beta$ -indolil-3-acetic acid (IUK) with bovine serum albumin, was received and used for determination of IAA contents in cultural liquids of microorganisms by competitive method of the ELISE with the use of antirabbit immunoglobulins, marked by peroxidase. The elaborated immune-enzyme test-system for quantitative determination of IAA in cultural liquids of microorganisms is proved to be convenient and reliable for IAA analysis.*

Key words: *phytohormones, indolilacetic acid, ELISE.*