



УДК 578.85/86.083.3

© 1993 Т. Н. Ерохина, С. М. Амбросова,
Ю. А. Варицев * Ю. С. Малофеева, В. П. Князева *,
А. В. Кулявцев

КОМБИНИРОВАННАЯ ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА А-ВИРУСА КАРТОФЕЛЯ

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва;

* НПО по картофелеводству Россельхозакадемии, пос. Коренево, Московская обл.

Получены моноклональные антитела (МА) подкласса IgG1 к А-вирусу картофеля (PVA). Определены их биохимические и иммунохимические свойства. МА испытаны в иммуноферментных тестах с 6 изолятами PVA. На основании изучения специфичности взаимодействия полученных МА с антигеном сделано предположение, что МА 5.3 реагируют с одним из универсальных вирусспецифичных эпитопов PVA. Проведено сравнение поли- и моноклональных антител в трех постановках DAS-ELISA (double antibody sandwich ELISA) варианта иммуноферментного анализа (ИФА) — моноклональном, поликлональном и комбинированном. Установлено, что наиболее широким спектром взаимодействия, максимальной чувствительностью и специфичностью обладает комбинированная тест-система, в которой в качестве иммобилизованных на подложке («нижних») антител использовали поликлональные антитела (ПА), а в качестве «верхних» — МА 5.3, конъюгированные с пероксидазой хрена (ПХ). Минимальная определяемая концентрация вируса в очищенных препаратах составляла 3—8 нг/мл, а в листьях растения-накопителя *Nicotiana tabacum* вирус определяли при разведении сока до 1:1280. Определение PVA в соке табака не выявило существенных различий между разработанной нами тест-системой и коммерческим набором фирмы Boehringer-Mannheim (Германия).

Использование ИФА в фитовирусологической практике позволило на несколько порядков повысить чувствительность и специфичность серологических тестов и дает возможность определять вирусы в нанogramмовом диапазоне концентраций. Однако повышение чувствительности анализа предъявляет высокие требования к качеству используемых антител.

Многие исследователи в настоящее время отдают предпочтение МА, получаемым методом соматической гибридизации клеток, перед традиционно используемыми ПА, вырабатываемыми в крови теплокровных животных в ответ на введение вирусного антигена [1—4]. По ряду характеристик, в частности гомогенности, высокой аффинности, специфичности и возможности получения практически в неограниченном количестве, МА превосходят ПА. В то же время

Принятые сокращения: МА и ПА — моноклональные и поликлональные антитела, ИФА — иммуноферментный анализ, ПХ — пероксидаза хрена, ПЭГ — полиэтиленгликоль, PBS — фосфатно-солевой буфер, PVA — potato virus A, DAS-ELISA — double antibody sandwich ELISA, TAS-ELISA — triple antibody sandwich ELISA, I-ELISA — indirect ELISA.

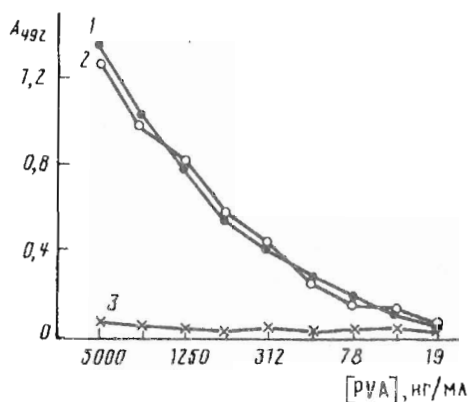


Рис. 1. Определение PVA в очищенных препаратах PVA-B-11 (1), PVA-H (2) с использованием МА 5.3. Контроль с вирусом мозаики резухи (3)

уникальная специфичность МА может служить препятствием при детекции серологически различающихся штаммов вирусов. Для устранения этого недостатка обычно используют комбинации двух или более МА, реагирующих с различными эпитопами, а также комбинации поли- и моноклональных антител [5—7].

В настоящее время МА получены более чем к 30 вирусам растений [8]. Большой практический интерес представляет получение МА к возбудителю одного из наиболее вредоносных вирусных заболеваний картофеля — А-вирусу картофеля (PVA). PVA — типичный представитель многочисленной группы потивирусов, имеющий однополовые РНК-содержащие вирионы размером 730×11 нм. В природе он представлен тремя группами штаммов, различающихся по патогенности [9].

Из-за отсутствия надежных диагностических средств PVA в Российской Федерации выявлен пока только на Дальнем Востоке [10], но в Западной Европе он широко распространен и вызывает снижение урожайности картофеля на 38—46% [11].

Целью настоящей работы было получение МА к PVA и создание на их основе иммуноферментной диагностической тест-системы.

На начальном этапе было получено 6 клонов, продуцирующих МА, специфичные к гомологичному изоляту PVA. Однако последующее тестирование с помощью 4 изолятов PVA (PVA-Bolko, PVA-Leda, PVA-H, PVA-Vocal) выявило их различия в эффективности связывания с вирусспецифичными эпитопами, что дало основание исключить клоны, имеющие узкую специфичность, и оставить для дальнейшей работы только 2 клон (5.3 и 11.4).

Изотипирование МА показало, что клон 5.3 продуцирует МА подкласса IgG1, а клон 11.4 — МА класса IgM. В дальнейшем клон 11.4 также был исключен вследствие низкого качества диагностикума, получаемого из продуцируемых им МА. Чувствительность определения PVA не превышала 60 нг/мл; кроме того, наблюдался высокий уровень неспецифического связывания. Дальнейшая работа проводилась только с клоном 5.3, обладающим достаточно высокой аффинностью ($K_a = 8,3 \cdot 10^{11} M^{-1}$). И хотя, по данным литературы, максимальная чувствительность тест-системы достигается, как правило, при оптимальном сочетании МА, специфичных к различным эпитомам, использование одного клон не исключает возможности создания тест-системы для ИФА [5, 12—14].

На основе МА, продуцируемых клоном 5.3, был приготовлен конъюгат с пероксидазой хрена и проведено определение PVA (изоляты PVA-B11 и PVA-H) в очищенных препаратах с использованием DAS-ELISA-варианта ИФА. Для сенсibilизации твердой фазы применяли МА 5.3 в концентрации 5 мкг/мл, в качестве проявляющих антител — конъюгат МА 5.3 с ПХ (рис. 1). Видно, что чувствительность выявления PVA в данной тест-системе составляет 20—30 нг/мл.

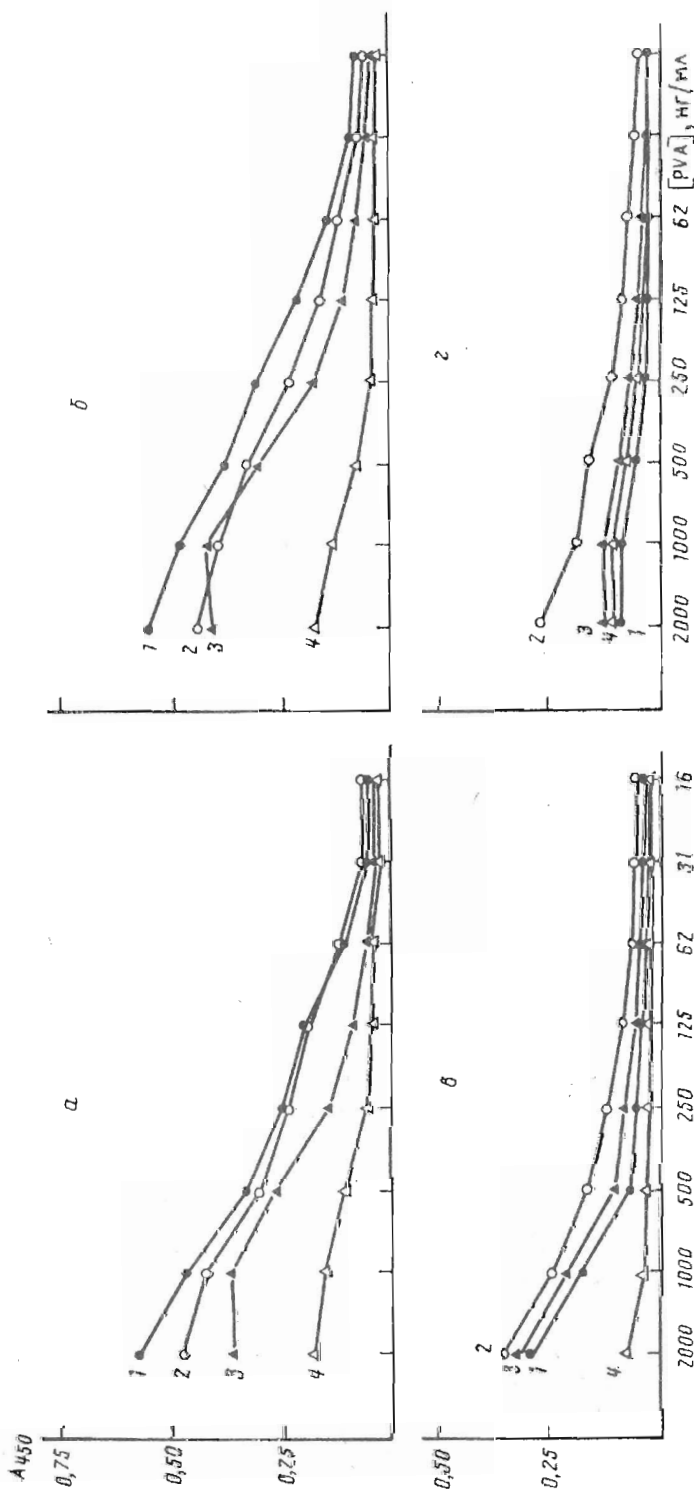


Рис. 2. Определение PVA в изолятах PVA-H (а), PVA-B-11 (б), PVA-Чернятица (в) и PVA-Volko (г) с применением МА АЗЕИД8 (1), 5.3 (2), 151.08 (3) и АЗН10Н4 (4)

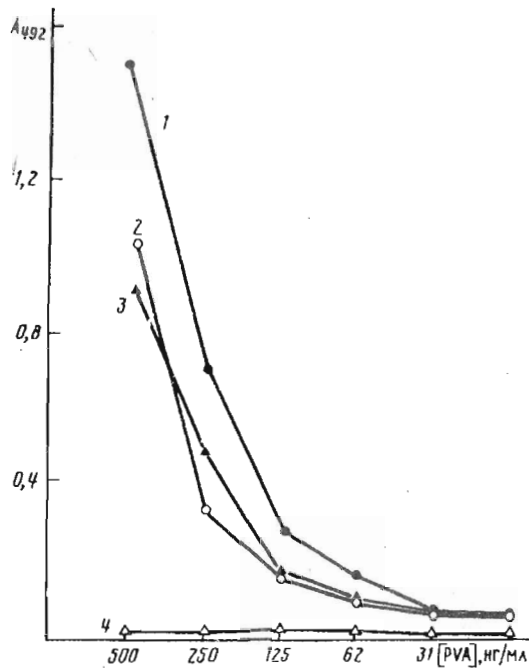


Рис. 3. Определение минимальной выявляемой концентрации PVA в очищенном препарате PVA-B-11 с применением комбинаций МА. Сенсibiliзирующие антитела — 151.08 (1), 5.3 (2), А3Е1D8 (3). Проявление конъюгатом МА5.3—ПХ. Контроль с вирусом мозаики резухи (4)

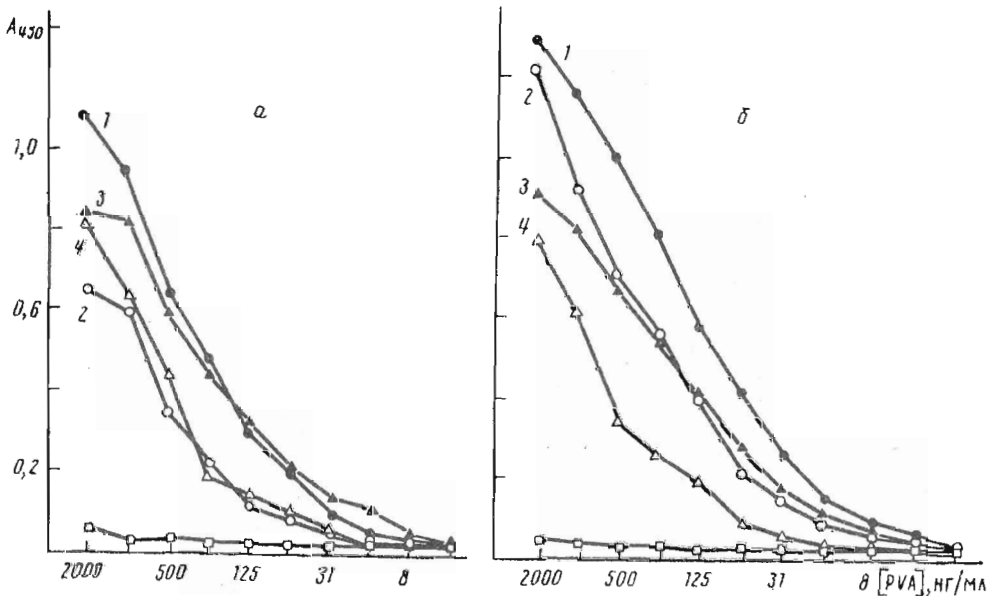


Рис. 4. Определение PVA в очищенных препаратах PVA-H (а) и PVA-B-11 (б) с применением комбинированных тест-систем. Сенсibiliзирующие антитела — ПА (1, 4), МА 5.3 (2, 3). Определение конъюгатом ПА—ПХ (3, 4), МА 5.3—ПХ (1, 2). Контроль (5) с γ -вирусом картофеля

Были испытаны МА к PVA, полученные в других лабораториях и любезно предоставленные авторам. В частности, для сенсibiliзации твердой фазы были использованы МА 151.08 из Научно-исследовательского и селекционного института овощеводства (г. Оломоуц, Чехо-Словакия), а также МА А3Е1D8 и А3Н10Н4

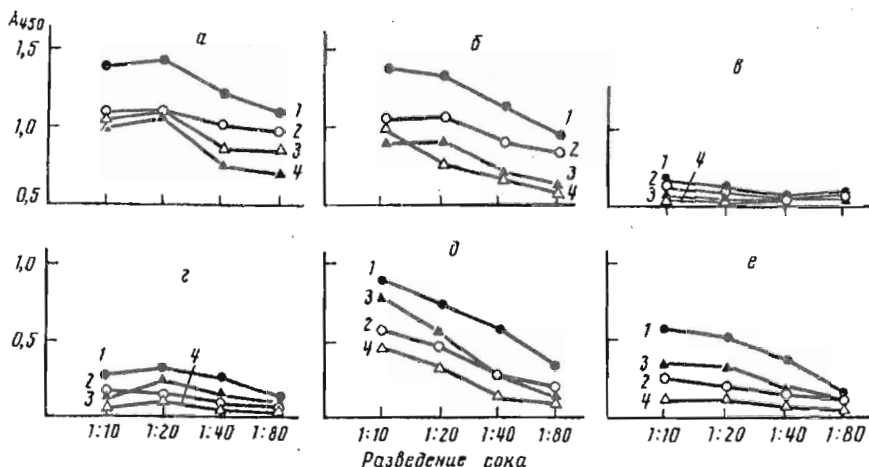


Рис. 5. Определение PVA в изолятах PVA-Н (а), PVA-B-11 (б), PVA-Leda (в), PVA-Bolko (г), PVA-Чернатица (д), PVA-Vocal (е) с применением комбинированных тест-систем. Сенсибилизирующие антитела — ПА (1, 4), МА 5.3 (2, 3). Проявление конъюгатом ПА—ПХ (2, 4), МА 5.3—ПХ (1, 3)

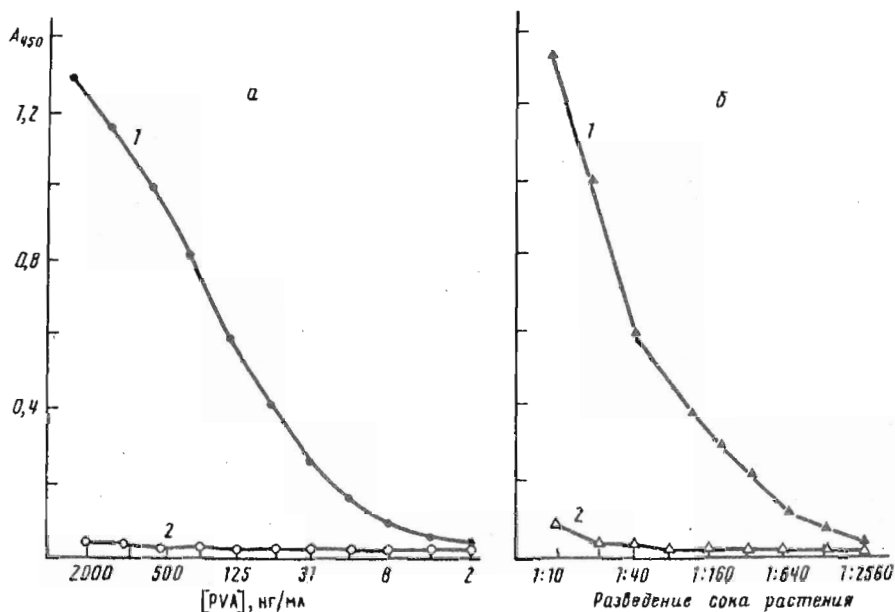


Рис. 6. Определение минимальной выявляемой концентрации PVA (1) в очищенном препарате вируса (а) и в соке зараженного растения (б) с применением разработанной комбинированной тест-системы. Сенсибилизация ПА, проявление МА 5.3. Контроль (2) с Y-вирусом картофеля (а) или с соком здорового растения (б)

из Института химической и биологической физики АН Эстонии. Во всех вариантах в качестве проявляющих антител использовали конъюгат МА 5.3 с ПХ (рис. 2). Уровень неспецифического связывания с Y-вирусом картофеля не превышал 0,02—0,03 OE_{450} . Полученные данные выявили различия МА в эффективности связывания с антигеном. С изолятами PVA-Н и PVA-B11 наиболее эффективно взаимодействовали МА АЗЕ1D8, а с изолятами PVA-Bolko и PVA-Чернатица — МА 5.3. Несколько менее эффективно реагировали с антигеном МА 151.08 и слабо реагировали со всеми изолятами МА АЗН10Н4. Логично предположить, что МА 5.3 взаимодействуют с универсальным эпитопом, присутствующим у всех испытанных изолятов PVA. Это дает основание рекомендовать МА 5.3 в качестве

основы для создания моноклональной тест-системы. Была определена минимальная концентрация антигена, выявляемая МА 5.3 в изоляте PVA-B11. Для сенсibilизации твердой фазы применяли МА 5.3, 151.08 и АЗЕ1D8. В качестве проявляющих антител использовали конъюгат МА 5.3 с ПХ (рис. 3). Из анализа кривых титрования можно заключить, что все испытанные сочетания МА практически не различались по чувствительности, которая составила 20—30 нг/мл.

С целью изучения диагностических возможностей комбинаций моно- и поликлональных антител была проведена серия экспериментов по определению вируса в трех вариантах DAS-ELISA: моноклональном (МА—PVA—МА-ПХ), поликлональном (ПА—PVA—ПА-ПХ) и комбинированном (МА—PVA—ПА-ПХ или ПА—PVA—МА-ПХ). На рис. 4 приведены кривые титрования очищенных препаратов PVA изолятов PVA-H (а) и PVA-B-11 (б). Из полученных данных следует, что минимальная определяемая концентрация PVA при использовании комбинированных тест-систем в 2—5 раз меньше, чем при использовании тест-систем с антителами одного типа (только ПА или только МА). При этом для всех испытанных тест-систем уровень неспецифических реакций был крайне низким ($A_{450} < 0,05$). Преимущество комбинированной тест-системы типа ПА—PVA—МА-ПХ было показано также при определении вируса в соке растений, зараженных изолятами вируса (рис. 5): PVA-H (а), PVA-B11 (б), PVA-Leda (в), PVA-Volko (г), PVA-Чернатица (д), PVA-Vocal (е). В качестве контроля использовали сок из листьев здорового табака. Уровень неспецифического связывания не превышал 0,02 OE_{450} .

Комбинированная тест-система с сенсibilизирующими ПА и детектирующими МА 5.3 была испытана в сравнении с коммерческим диагностическим набором к PVA фирмы Boehringer-Mannheim, в котором использованы ПА, а в качестве детектирующей метки — щелочная фосфатаза. Определение предельных разведений сока табака, инфицированного PVA, не выявило существенных различий между комбинированной тест-системой и коммерческим набором по чувствительности теста.

Таким образом, в результате проведенных экспериментов сконструирована иммуноферментная диагностическая тест-система на основе моно- и поликлональных антител (рис. 6). При этом чувствительность определения PVA в очищенном препарате составляет 3—8 нг/мл (рис. 6а), а в соке зараженного растения вирус определяется при разведении 1:1280 (рис. 6б). Использование ПА для сенсibilизации планшета расширяет спектр взаимодействия антител с различными изолятами PVA, а применение МА в составе конъюгата обеспечивает специфичность определения, а также стандартность диагностической системы. Система апробирована на 6 изолятах PVA и может служить основой для выпуска коммерческих диагностических наборов.

Экспериментальная часть

В работе использовали среду RPMI-1640, 50-кратные растворы селективных сред НАТ и НТ, эмбриональную телячью сыворотку (Gibco, Англия), ПЭГ-1500, диметилсульфоксид (Merck, Германия), пероксидазу из корней хрена (Grad 1; Boehringer-Mannheim, Германия), диагностический набор для определения подкласса антител (Calbiochem, США), МА к PVA 151.08 из Научно-исследовательского и селекционного института овощеводства (г. Оломоуц, Чехо-Словакия), а также АЗЕ1D8 и АЗН10Н4 из Института химической и биологической физики АН Эстонии (г. Таллинн, Эстония), белок-А-сефарозу (Pharmacia, Швеция), 96-луночные планшеты для ИФА, 24- и 96-луночные планшеты для культур клеток Linbro (Flow Lab., Шотландия), орто-фенилендиамин, пристан (Sigma, США), бычий сывороточный альбумин (BCA), Твин-20, компоненты буферных растворов (Serva, Германия).

Использовали изоляты PVA: PVA-Vocal, PVA-Чернатица, получены из Центральной опытной станции по селекции и сортоподдержанию (г. Пловдив, Бол-

гария); PVA-Bolko, PVA-Leda из Института картофеля (г. Бонин, Польша); PVA-B-11 из Института фитопатологии (г. Ашерслебен, Германия); PVA-H от фирмы Mericlon (Венгрия).

Накопление и выделение очищенных препаратов изолятов PVA проводили по методике, описанной в работе [15].

Концентрацию PVA (мг/мл) в очищенных препаратах определяли по формуле

$$\frac{A_{260} \cdot \text{фактор разведения}}{2,65}$$

где A_{260} — поглощение раствора при длине волны 260 нм, 2,65 — эмпирический коэффициент, соответствующий поглощению (A_{260}) раствора PVA с концентрацией, равной 1 мг/мл [16].

Поликлональные антитела к PVA получали путем иммунизации кроликов по методике, принятой в отделе биотехнологии НПО по картофелеводству [15]: первая иммунизация — 200 мкг PVA внутривенно: через 2 нед 200 мкг PVA в смеси с полным адьювантом Фрейнда вводили подкожно в несколько точек на спине животного: через 2 нед делали такую же инъекцию с неполным адьювантом Фрейнда. Кровь отбирали через 2—4 нед после последней инъекции. Титр сыворотки $1 \cdot 10^4$.

Получение моноклональных антител к PVA. Иммунизацию мышей линии BALB/c проводили по схеме, отработанной ранее применительно к растительным вирусам [12]: первая инъекция — 50 мкг PVA в полном адьюванте Фрейнда внутривенно. Через 2 нед вторая инъекция — 30—50 мкг PVA в неполном адьюванте Фрейнда внутривенно. Через 2 нед бусторная инъекция — 30—50 мкг PVA в PBS.

Титр антител в крови составлял $1:10^5$ — $1:5 \cdot 10^5$. Гибридомы получали путем слияния клеток мышиной миеломной линии P3X63.Ag8.653 со спленоцитами мышей, иммунизированных PVA, с помощью 50% ПЭГ-1500 по стандартной методике [17].

Отбор клонов, продуцирующих МА к PVA, проводили в двух вариантах ИФА: 1) *I-ELISA* (indirect-ELISA), при котором на планшете сорбировали очищенный вирус (2—5 мкг/мл), затем вносили культуральную жидкость, содержащую МА, наличие которых выявляли с помощью козьих антител против IgG мыши, конъюгированных с ПХ; 2) *TAS-ELISA* (triple antibody sandwich-ELISA), при котором на планшет наносили кроличьи ПА к PVA (5 мкг/мл), затем на них сорбировали вирус, содержащийся в соке листьев табака, инфицированного различными изолятами PVA. Связавшиеся с вирусом МА определяли так же, как в I-ELISA-варианте ИФА. Для дальнейшей работы отбирали клоны, реагирующие с антигеном в обоих постановках ИФА и не дающие неспецифической реакции.

Клонирование и реклонирование гибридных клеток осуществляли методом предельных разведений. Асцитные жидкости, содержащие МА, получали путем введения 2—5 млн. гибридных клеток в брюшную полость мышей линии BALB/c, предварительно сенсибилизированных пристаном.

Гибридомы хранили в криозащитной среде, состоящей из 85% эмбриональной телячьей сыворотки и 15% диметилсульфоксида, в контейнерах с жидким азотом.

Подкласс МА определяли методом ИФА с использованием кроличьих антител против подклассов иммуноглобулинов мыши по прилагаемой к набору инструкции.

Константу связывания МА с эпитопами на поверхности антигена определяли с помощью неконкурентного ИФА [18].

Конъюгат МА с пероксидазой хрена получали по методу [19]. Полученный конъюгат смешивали с равным объемом глицерина и хранили при -20°C .

Получение растительных экстрактов. Выжимали сок из листьев зараженных или здоровых растений с помощью механического или вальцового пресса и смешивали с фосфатно-солевым буфером (PBS) в соотношении 1:10 (объем сока/объем буфера).

Определение PVA с помощью комбинированной тест-системы в DAS-ELISA-

варианте ИФА. В качестве твердой фазы использовали полистирольные планшеты для ИФА с 96 лунками, сенсibilизированные ПА (5 мкг/мл) в 100 мкл 0,02 М бикарбонатного буфера, pH 9,6, в течение ночи при 4° С. Затем в лунки вносили 100 мкл 1% раствора БСА в PBS и инкубировали 1 ч при 20° С. После этого вносили 100 мкл вирусосодержащего материала, последовательно разведенного PBS, содержащего 0,05% Твин-20 (PBS-Твин), и инкубировали 2 ч при 20° С. Затем вносили МА 5.3, конъюгированные с ПХ, в 100 мкл PBS-Твин в рабочем разведении и инкубировали 1 ч при 20° С. Пероксидазу определяли с помощью 100 мкл субстратной смеси (0,4 мг/мл *o*-фенилендиамина в цитратном буфере, pH 5,0, и 0,03% перекись водорода). Реакцию останавливали 100 мкл 1 М H₂SO₄.

После каждой инкубации микроплаты промывали 3—5 раз PBS-Твин. Количественно результаты ИФА измеряли на вертикальном фотометре Titertek Multiskan (Flow Lab., Шотландия) при 492 или 450 нм, если реакцию не останавливали.

Результаты представляли в виде зависимости величины оптического поглощения продукта ферментативной реакции от концентрации антигена в пробах (кривые титрования). За чувствительность метода принимали концентрацию антигена (или разведение анализируемого растительного экстракта), при котором величина оптической плотности продукта ферментативной реакции в 2 раза превышает поглощение в контрольной пробе. В качестве контроля при тестировании использовали препарат вируса мозаики резухи, а также экстракт из листьев здоровых растений.

Авторы выражают искреннюю признательность сотрудникам, предоставившим моноклональные антитела для испытаний.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sander E., Dietzgen R. G. // *Adv. Virus Res.* 1981. V. 29. P. 131—162.
2. Van Regenmortel M. V. // *Microbiol. Sci.* 1984. V. 1. № 3. P. 73—77.
3. Halk E. L. // *Ann. Rev. Phytopathol.* 1985. V. 23. P. 321—350.
4. Hill G. H., Bryant G. R., Durand D. P. // *J. Virol. Meth.* 1981. V. 3. P. 27—35.
5. Gugerli P., Fries P. // *J. Gen. Virol.* 1983. V. 64. P. 2471—2477.
6. Martin R. R., Stace-Smith R. // *Can. J. Plant Pathol.* 1984. V. 6. P. 206—210.
7. Halk E. L., Hsu H. T., Aebig J., Franke J. // *Phytopathology.* 1984. V. 74. № 3. P. 367—372.
8. Саарма М. Ю., Ярвекюльг Д. В. // *Журн. Всесоюз. хим. о-ва им. Д. И. Менделеева.* 1989. Т. XXXIV. № 1. С. 77—80.
9. Bartels R. // *Potato virus A. C. M. I. A. A. B. Description of plant viruses.* 1971. № 54.
10. Gnutova R. V., Krylov A. V. // *Acta phytopathol. Acad. sci. Hung.* 1975 (1976). V. 10. № 3—4. P. 195—201.
11. Hunnius W. // *Potato Res.* 1976. V. 19. P. 371—376.
12. Плечко Т. Н., Кириллов А. В., Амбросова С. М., Борисова О. Б., Одинец А. Г. // *Биоорган. химия.* 1991. Т. 17. № 2. С. 223—231.
13. Paul F., Dinez J. // *J. Virol. Meth.* 1989. V. 25. P. 153—166.
14. Венгеров Ю. Ю., Буларгина Т. В., Куц А. А., Воробьев С. М., Северин Е. С. // *Биотехнология.* 1987. Т. 3. № 3. С. 291—295.
15. Варацва Г. П., Варацва Ю. А. // *Научн. тр. НИИКХ. Биотехнология в картофелеводстве.* 1991. С. 57—62.
16. Gugerti P. // *Phytopath. Z.* 1979. V. 96. S. 97—107.
17. Kohler G., Milstein C. // *Nature.* 1975. V. 256. P. 495—497.
18. Beatty J. D., Beatty G. B., Vlahos W. G. // *J. Immunol. Meth.* 1987. V. 100. № 1. P. 173—179.
19. Niekne P. K. // *Immunoassays: Clinical Laboratory Techniques for the 1980s.* P. 157—169.

Поступила в редакцию
23.II.1993

После доработки
20.V.1993

T. N. Erokhina, S. M. Ambrosova, Yu. A. Varitsev,
Yu. S. Malofeyeva, V. P. Knyazeva*, A. V. Kouliavtsev*

**A HYBRID IMMUNOENZYME TEST SYSTEM FOR THE POTATO
VIRUS A DETECTION**

*M. M. Shemyakin and Yu. A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry,
Russian Academy of Sciences, Moscow;*

** Institute of Potato Research, Russian Agricultural Academy, Moscow Region*

Monoclonal antibodies (Mab's) to potato virus A (PVA) were obtained. Subclass of Mab's and their affinity constant were determined. Interaction of Mab's with six PVA isolates from different regions was demonstrated. Three variants of DAS-ELISA (monoclonal, polyclonal and hybrid) for purified virus preparations and plant juices were characterised. Specificity and sensitivity of the antigen detection by our Mab 5.3 and several Mab's to PVA from another researchers were compared. An optimal combination of monoclonal and polyclonal antibodies for the PVA immunoassay was selected. The sensitivity of the DAS-ELISA for purified virus preparation was 3—8 ng PVA per milliliter. PVA detection in tobacco juice did not reveal significant differences between our test system and the Boehringer-Mannheim commercial set.