



УДК 578.85/86.083.3

© 1994 С. М. Амбросова, Ю. С. Малофеева,  
Л. Т. Дзиркале\*

## ХАРАКТЕРИСТИКА МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ К ВИРУСУ АСПЕРМИИ ТОМАТОВ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ В ДИАГНОСТИКЕ

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

\* *Латвийский сельскохозяйственный университет, г. Елгава, Латвия*

Ключевые слова: вирус аспермии томатов; гибридомы; моноклональные антитела; иммуноферментная тест-система.

Получены четыре стабильные гибридомные линии, продуцирующие моноклональные антитела (МА) к вирусу аспермии томатов (*Tomato aspermy virus* — TAV). Для всех клонов определены подкласс и константа связывания с антигеном. Изучено взаимодействие полученных МА с тремя штаммами TAV. С помощью конкурентной реакции выделены два МА, распознающие различные эпитопы на белковой оболочке вируса. На основе этих МА разработана иммуноферментная тест-система, позволяющая определить очищенный вирус в концентрации 1—5 нг/мл, а в экстракте листьев зараженного растения — при предельном разведении в 640 раз.

При разработке диагностических иммуноферментных тест-систем для определения вирусов, в том числе и растительных, необходимо учитывать их антигенную специфичность. Работами многих исследователей показано, что по антигенным свойствам вирусы и их штаммы могут существенно различаться и вызывать на поражаемых растениях различные симптомы заболевания [1—3]. Особенно это необходимо учитывать при применении для диагностических целей МА, позволяющих идентифицировать групп-, вирус- и штаммоспецифические эпитопы белковой оболочки вирусов. Необходимое условие успешного применения МА — их типоспецифическая направленность, что расширяет область применения МА в диагностике вирусов, представленных разнообразными штаммами [3—5].

Объектом наших исследований был выделенный в Латвии вирус аспермии томатов (TAV), поражающий овощные и цветочно-декоративные культуры. Потери урожая томатов при зараженности этим вирусом достигают 30—50% [6]. С помощью растений-индикаторов из хризантем, зараженных природным изолятом вируса, были выделены три изолята, различающиеся по степени патогенности и индуцируемым симптомам. На основании их биологических, серологических

Принятые сокращения: TAV — вирус аспермии томатов, МА — моноклональные антитела, ПХ — пероксидаза хрена.

Адрес для переписки: 117871, ГСП-7, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10, Амбросовой С. М.

Некоторые характеристики МА, взаимодействующих с ТАВ

| Клон | Суб-класс         | $K_a \cdot 10^{-10}, M^{-1}$ |       |       | Титр антител                                  |       |       |                           |       |       | Кон-<br>куренция с<br>G10-ПХ * |
|------|-------------------|------------------------------|-------|-------|---|-------|-------|---------------------------|-------|-------|--------------------------------|
|      |                   |                              |       |       | культуральная<br>жидкость ( $\cdot 10^{-2}$ ) |       |       | асцит ( $\cdot 10^{-5}$ ) |       |       |                                |
|      |                   | TAV-1                        | TAV-2 | TAV-3 | TAV-1   | TAV-2 | TAV-3 | TAV-1                     | TAV-2 | TAV-3 |                                |
| G10  | IgG <sub>2a</sub> | 3,7                          | 6,8   | 5,6   | 1,0   | 1,5   | 1,5   | 5,0                       | 1,0   | 1,0   | +                              |
| A2   | IgG <sub>3</sub>  | 2,6                          | 3,3   | 3,0   | 1,0   | 1,3   | 1,5   | 10,0                      | 18,0  | 20,0  | +                              |
| C8   | IgG <sub>1</sub>  | 1,8                          | 2,5   | 1,7   | 1,2   | 1,5   | 1,0   | 0,1                       | 0,25  | 0,5   | -                              |
| F9   | IgG <sub>1</sub>  | н/о                          | н/о   | н/о   | 0,05  | 1,0   | 1,3   | 0,01                      | 0,02  | 0,02  | н/о                            |

\* «+» — наблюдается конкуренция за связывание антигена, «-» — конкуренция отсутствует, н/о — не определяли.

и физико-химических свойств эти изоляты выделены в отдельные штаммы и обозначены как TAV-1, TAV-2, TAV-3. Наиболее патогенен TAV-1 [7, 8]. Методом олигонуклеотидного картирования были выявлены различия в нуклеотидной последовательности геномных РНК-3, сосредоточенных в 3'-концевой половине РНК, где закодирован белок оболочки [9]. Предполагается [10], что обнаруженные различия в структуре геномных РНК-3 могут играть существенную роль в проявлении различных симптомов в процессе заражения растений.

Цель данного исследования — получение МА к ТАВ и разработка на их основе диагностической тест-системы для определения вируса в растительном материале методом ИФА. В ходе исследований необходимо было решить следующие задачи: получить и охарактеризовать анти-ТАВ МА; исследовать специфическое взаимодействие полученных антител с тремя штаммами вируса; определить эпитопную специфичность МА и выбрать антитела, пригодные для диагностики зараженного материала; провести сравнительное испытание ИФА-тестов на основе моно- и поликлональных антител.

Ранее было показано, что применение поликлональных антител для определения ТАВ достаточно успешно. В очищенном препарате вирус определяли в концентрациях до 5 нг/мл. В пораженных растениях хризантем ТАВ можно было определить при разведении сока в 1000 раз [1]. Однако в некоторых случаях применение МА более целесообразно, так как они могут быть использованы для идентификации различных изолятов, а также, что особенно ценно, в рутинной диагностике вируса в сельскохозяйственных культурах, поскольку их возможно получать в неограниченных количествах. Кроме того, применение МА дает возможность повысить специфичность определения и обеспечить стандартность.

Из 3 независимо проведенных гибридизаций получено 6 положительных клонов. Два из них потеряли антителопродуцирующую активность при последующем наращивании культуры. Для дальнейшей работы были отобраны 4 клон, обладающие стабильной антителопродуцирующей активностью (таблица).

Все МА взаимодействовали с очищенным препаратом ТАВ в непрямом и сэндвич-ИФА. Из таблицы видно, что величина титра культуральной жидкости существенно не различается для всех клонов, в то же время титр асцитной жидкости меняется от  $1 \cdot 10^3$  для F9 до  $1 \cdot 10^6$  для A2, причем такое соотношение сохраняется при взаимодействии как с гомологичным, так и с гетерологичными штаммами ТАВ. МА выделяли из асцитной (G10) или культуральной жидкости (C8) методом аффинной хроматографии на белок-A-сефарозе.

Важным параметром, характеризующим специфичность МА, является константа связывания ( $K_a$ ) с эпитопом на поверхности белковой оболочки вируса. По полученным данным, все МА имеют достаточно высокое значение  $K_a$  ( $1,7-6,8$ )  $\cdot 10^{10} M^{-1}$  при взаимодействии с антигенными сайтами всех трех штаммов ТАВ.

Специфичность МА к ТАВ изучали методом конкурентного ИФА. Чтобы выяснить, с каким числом антигенных детерминант реагируют МА трех гибридных



линий, исследовали конкуренцию за связывание с вирусом между МА, продуцируемыми клоном G10, не меченными и меченными пероксидазой хрена. Антиген, иммобилизованный на поверхности полистирольных планшетов, инкубировали в присутствии различных количеств свободных МА А2 и С8, а затем без отмывки вносили в лунки конъюгат G10 с ПХ. Если детерминанты, к которым направлены меченные и не меченные ферментом МА, совпадают, количество связавшегося с вирусом конъюгата резко уменьшается по мере увеличения концентрации немеченых блокирующих антител. Пример такого определения показан на рис. 1. Из него можно сделать вывод, что МА G10 и А2 направлены к одной или нескольким стерически сближенным антигенным детерминантам, а С8 — к другой.

Принцип разработки тест-системы заключался в подборе комбинации МА, распознающих два разных эпитопа оболочки. Первое МА сорбируется на твердой фазе, второе используется для выявления связанного вируса. Известно, что чувствительность тест-системы в сэндвич-ИФА определяется аффинностью антител, используемых в качестве сенсibiliзирующих, а также аффинностью конъюгата антител с ферментом. Учитывая это, исследовали возможность использования МА G10, А2, С8 и F9 для сорбции на полистирольной твердой фазе (рис. 2). Во всех случаях использовали конъюгат G10-ПХ. Как и следовало ожидать, максимальная чувствительность определения, равная 1—5 нг/мл, достигается для всех трех штаммов ТAV при использовании в подложке МА С8, при сенсibiliзации МА А2 она составляет 100—300 нг/мл, при сорбции поликлональных антител — от 40 нг/мл для ТAV-3 до 100 нг/мл для ТAV-2. При сенсibiliзации твердой фазы МА F9 чувствительность составляла 300—800 нг/мл (данные не приведены).

Полученные результаты свидетельствуют о целесообразности использования в тест-системе комбинации МА G10 и С8, распознающих взаимно удаленные детерминанты. Система была апробирована на соке растений, зараженных ТAV-2 (рис. 3). Из панели анти-ТAV МА для определения в сэндвич-ИФА как очищенного ТAV, так и вируса в растительном материале наиболее чувствительной оказалась комбинация МА С8 и конъюгата МА G10 с ПХ. В экстракте из листьев зараженного растения вирус определяли при разведении более чем в 640 раз.

Таким образом, получены и охарактеризованы МА к ТAV. С помощью конкурентной реакции выделены два МА, распознающие различные эпитопы на белковой оболочке вируса. Показано, что анти-ТAV МА взаимодействуют со всеми тремя латвийскими штаммами ТAV. На основе МА разработана тест-система для определения как очищенного ТAV, так и вируса в растительном материале. Чувствительность определения ТAV в сэндвич-ИФА для очищенного вируса составила 1—5 нг/мл, а в экстракте зараженного материала — при предельном разведении более чем в 640 раз

### Экспериментальная часть

В работе использовали среды RPMI-1640, NAT-RPMI-1640, NT-RPMI-1640, эмбриональную телячью сыворотку (Flow, Англия); адьювант Фрейнда (Calbiochem, США); поликлональные антитела к ТAV (кафедра вирусологии МГУ); конъюгат кроличьих антимышинных антител с пероксидазой хрена (DAKO-Immunoglobulins, Дания); *o*-фенилендиамин (Sigma, США); пероксидазу хрена (Boehringer-Mannheim, ФРГ); ПЭГ-1500 (Merck, ФРГ); диметилсульфоксид (Merck, ФРГ); набор для изотипирования подклассов мышинных иммуноглобулинов (Calbiochem, США); Пристан (Sigma, США); бычий сывороточный альбумин (Serva, ФРГ); Твин-20 (Sigma, США); белок-А-сефарозу (Pharmacia, Швеция); 96-луночные планшеты для иммуноанализа (NUNC, Дания); 96- и 24-луночные планшеты для культур клеток (Flow, Англия).

Вирусный материал размножали на растениях *Nicotiana tabacum* и *N. rustica*. Вирус выделяли по методике [11]. Выход вирусного материала для ТAV-1 и

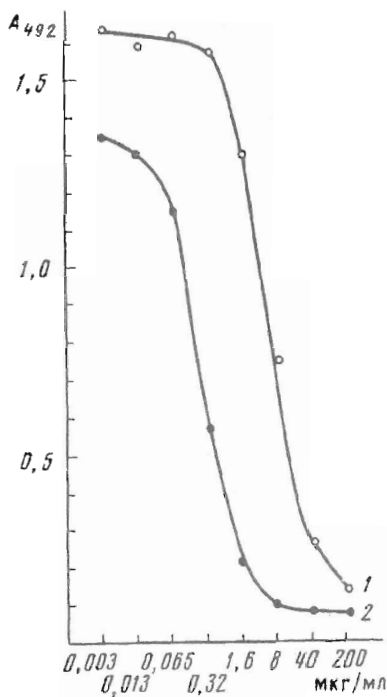


Рис. 1

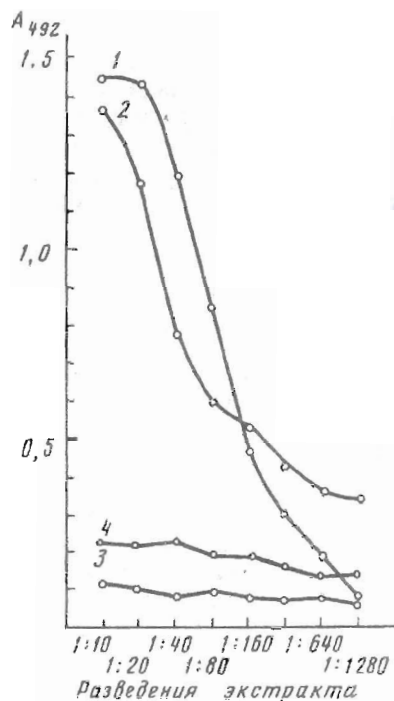


Рис. 3

Рис. 1. Конкуренция немеченых МА с конъюгатом МА G10-ПХ в сэндвич-ИФА. Блокирующие антитела — С8 (1), А2 (2). По оси абсцисс — концентрация немеченых МА

Рис. 3. Определение TAV-2 в растительном экстракте. 1, 3 — сенсibilизация МА С8, конъюгат — МА G10 с ПХ; 2, 4 — сенсibilизация поликлональными антителами к TAV, конъюгат — МА G10 с ПХ; 3, 4 — контроль с экстрактом листьев здорового растения

TAV-2 был равен 50—100 мг на 1 кг листьев, в то время как выход TAV-3 обычно составлял 10 мг и не превышал 30 мг на 1 кг исходного материала. Очищенный вирус хранили в 50% глицерине при  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Иммунизацию мышей линии BALB/c проводили по следующей схеме: 1-я инъекция — 50 мкг вирусного препарата TAV-1 в соотношении 1:1 с полным адьювантом Фрейнда внутривентрально; 2-я и 3-я инъекции — через 14 и 28 сут соответственно, аналогично первой, с использованием неполного адьюванта Фрейнда; за 4 сут до гибридизации животным вводили бустерную дозу — 100 мкг антигена без адьюванта.

Гибридизацию проводили по методике, изложенной в работе [12]. Спленоциты иммунной мыши гибридизовали с клетками мышинной миеломы Ра1 в соотношении 1:5. Клонирование гибридом осуществляли методом лимитирующего разведения [13]. После появления колоний (10—14-е сут) культуральную жидкость тестировали на присутствие специфических МА методом TAS-ELISA [14].

МА из асцитной или культуральной жидкости выделяли осаждением сульфатом аммония с последующей аффинной хроматографией на белок-A-сефарозе по методике, изложенной в работе [12].

Подкласс МА определяли методом ИФА с использованием козьих антител против подклассов иммуноглобулинов мыши по приложенной к набору для изотипирования инструкции.

Константу связывания антител с эпитопами на поверхности антигена определяли с помощью неконкурентного ИФА [15].

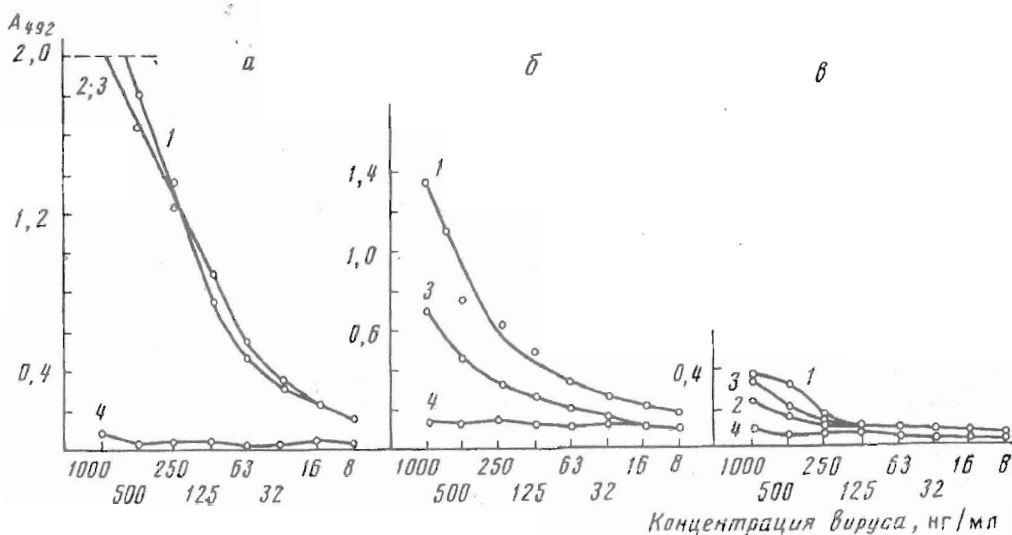


Рис. 2. Сравнительное определение TAV-1 (3), TAV-2 (2) и TAV-3 (1) в очищенном препарате вируса с помощью различных тест-систем. а — моноκлональная тест-система (для сенсibilизации использованы МА С8, для конъюгации с ПХ — МА G10); б — комбинированная тест-система (для сенсibilизации использованы полиκлональные антитела к TAV, конъюгат — МА G10 с ПХ); в — моноκлональная тест-система (сенсibilизация МА А2, конъюгат — МА G10 с ПХ); 4 — контроль с очищенным препаратом вируса штриховатой мозаики ячменя

Эпитопную специфичность полученных МА определяли методом конкурентного ИФА [16].

Конъюгаты МА с ПХ получали по методу [16]. Полученный конъюгат смешивали с равным объемом глицерина и хранили при  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Растительные экстракты получали согласно методике [11].

TAV определяли с помощью разработанной тест-системы в сэндвич-варианте ИФА по следующей схеме: в лунки планшета для иммуноанализа последовательно вносили:

1) 50 мкл раствора МА С8 в 0,1 М фосфатно-солевом буфере, рН 7,4 (PBS), в концентрации 2 мкг/мл и инкубировали в течение ночи при  $4^{\circ}\text{C}$  или 2 ч при  $37^{\circ}\text{C}$ ;

2) 50 мкл блокирующего 1% раствора бычьего сывороточного альбумина в PBS и инкубировали 45 мин при  $20^{\circ}\text{C}$ ;

3) 50 мкл тестируемого вирусосодержащего материала, последовательно разведенного PBS-Твин в 2 раза, и инкубировали 1—2 ч при  $20^{\circ}\text{C}$ ;

4) 50 мкл раствора конъюгата МА G10 с ПХ в PBS-Твин в рабочем разведении и инкубировали 1 ч при  $20^{\circ}\text{C}$ ;

5) 50 мкл субстратной смеси (о-фенилендиамин в концентрации 1 мг/мл в 0,1 М цитратном буфере, рН 5,0, с 0,003% (по объему) пероксида водорода).

Между стадиями планшеты промывали 3—5 раз PBS, содержащим 0,05% Твин-20. Развитие окраски останавливали внесением в лунки по 50 мкл 1 М раствора  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Интенсивность окрашивания определяли на сканирующем фотометре с вертикальным лучом Titertek Multiskan при длине волны 492 нм.

Результаты представляли в виде зависимости величины оптической плотности от концентрации антигена (кривые титрования). За чувствительность метода принимали концентрацию антигена или разведение растительного экстракта, при которых оптическая плотность в пробе в 2 раза превышает таковую в контроле.



## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дзиркале Л. Т. Сравнительная биологическая и физико-химическая характеристика трех штаммов вируса аспермии томатов. Автореф. канд. дис. Киев: Ин-т микробиологии и вирусологии АН Украины, 1987.
2. Гнутова Р. В., Какарека Н. Н., Сибирякова И. И., Толкач В. Ф., Рублева Н. В., Козловская З. Н., Корж В. Г. // Биол. науки. 1990. № 10. С. 20—26.
3. Jordan R., Hammond J. // J. Gen. Virol. 1991. V. 72. № 1. P. 25—36.
4. Yewdell J. W., Gerhard W. // Ann. Rev. Microbiol. 1981. V. 35. P. 185—206.
5. Андреева Е. Г. Изучение антигенной структуры А и У вирусов картофеля с помощью моноклональных антител и разработка тест-систем для их определения. Автореф. канд. дис. М.: МГУ, 1993.
6. Najtorad M. R., Dietzgen R. G., Franck R. I. B. // J. Gen. Virol. 1990. V. 71. P. 2809—2816.
7. Дзиркале Л. Т., Игнаш Я. Р. // Тр. Латв. СХА. 1991. Вып. 191. С. 40—44.
8. Дзиркале Л. Т., Эглите Г. К. // Тез. докл. научно-практ. конф. Минск, 1979. Ч. 1. С. 119—120.
9. Дзиркале Л. Т., Родионова Н. П. // Тр. Латв. СХА. 1991. Вып. 191. С. 44—48.
10. Эглите Г. К., Дзиркале Л. Т., Фелдмане Г. Я., Дук А. Э. // Изв. АН ЛатвССР. 1986. № 11. С. 104—107.
11. Дзиркале Л. Т., Родионова Н. П. // Тр. Латв. СХА. 1977. Вып. 136. Ч. 1. С. 38—43.
12. Плечко Т. Н., Кириллов А. В., Амбросова С. М., Борисова О. Б., Одинаев А. Г. // Биоорганическая химия. 1991. Т. 17. № 2. С. 223—231.
13. Амбросова С. М., Кириллов А. В., Сухачева Е. А., Бобкова А. Ф., Нацалишвили Н. М., Малофеева Ю. С., Атабеков И. Г. // Биоорганическая химия. 1992. Т. 18. № 8. С. 1089—1097.
14. Martin R. R., Stace-Smith R. // Can. J. Plant Pathol. 1984. № 6. P. 206—210.
15. Torrance L., Pead M. T. // Develop. Appl. Biol. 1986. № 1. P. 89—101.
16. Егоров А. М., Осипов А. Б., Дзантшев Б. Б., Гаврилова Е. М. Теория и практика иммуноферментного анализа. М.: Высшая школа, 1991.

Поступила в редакцию  
1.III.1994

*S. M. Ambrosova, Yu. S. Malofeyeva, L. T. Dzirkale\**

### CHARACTERIZATION OF MONOCLONAL ANTIBODIES TO TOMATO ASPERMY VIRUS AND THEIR USE IN DIAGNOSTICS

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

*\* Latvia University of Agriculture, Jelgava, Latvia*

Key words: hybridoma, tomato aspermy virus (TAV), monoclonal antibodies, immunoenzymatic test-system.

Four hybridomas, producing monoclonal antibodies (Mab's) to tomato aspermy virus (TAV), were obtained. The subclasses of 4 Mab's and their affinity constants were determined. All Mab's showed similar interaction with three TAV strains. The competitive ELISA was used to evaluate the specificity of Mab's; C8 and G10 Mab's recognized different epitopes on the TAV surface. The sandwich-ELISA with the C8 Mab to capture the antigen and the G10 Mab as the enzyme-conjugated second antibody had a high specificity and sensitivity. It was able to detect 1—5 ng/ml TAV in purified virus preparations and to detect the virus in more than 640-fold diluted extracts from infected plants.

Address: Dr. S. M. Ambrosova, Miklukhe-Malfaya st., 16/10, Moscow, GSP-7, 117871.