



УДК 578.85186.083.3

## МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА К ВИРУСУ ЖЕЛТОЙ КАРЛИКОВОСТИ ЯЧМЕНЯ. ИММУНОФЕРМЕНТНАЯ ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ВИРУСА

© 1995 г. Т. Н. Ерохина

*Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,  
117871, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10*

Поступила в редакцию 26.04.94 г.

Получено пять стабильных линий гибридом, продуцирующих моноклональные антитела к вирусу желтой карликовости ячменя (Barley yellow dwarf virus). Пять моноклональных антител выделены из асцитных или культуральных жидкостей и охарактеризованы. Все моноклональные антитела принадлежат к классу IgG и имеют высокие константы связывания с антигеном ( $8.8 \times 10^8 - 1.1 \times 10^{12} \text{ M}^{-1}$ ). Антитела 4В5 отобраны для использования в моноклональной тест-системе. Антитела 1D2 и 3С3 различают два изолята вируса желтой карликовости ячменя, выделенные из полевого материала в 1992 и 1993 гг. Минимальная концентрация вируса, определяемая в очищенном препарате, составила 7 - 8 нг/мл. Проведено определение вируса в экстрактах овса и ячменя из разных регионов России. Моноклональная тест-система позволяет выявлять вирус желтой карликовости ячменя в экстрактах до разведения 1 : 128. Ни одно из полученных антител не взаимодействует с четырьмя различными изолятами вируса скручивания листьев картофеля, также относящегося к лютеовирусам.

*Ключевые слова: вирус желтой карликовости ячменя, моноклональные антитела, иммуноферментная тест-система.*

Вирус желтой карликовости ячменя (BYDV) – типичный представитель группы лютеовирусов. Это изометрический вирус с размером частиц 22 - 30 нм, содержащий однонитевую РНК с  $M 2.0 \times 10^6$ . Он вызывает одно из самых распространенных заболеваний злаков в мире и является причиной значительного снижения урожайности злаковых культур. В тканях растения вирус накапливается только во флоэме в очень низких концентрациях [1]. Вирус переносится на растения тлей. Известно пять штаммов BYDV (PAV, MAV, RPV, SGV и RMV), которые различаются по виду переносящей их тли и способу переноса, а также имеют серологические различия [2]. Диагностика вируса в зараженных растениях всегда была трудной задачей, так как заболевание часто бессимптомно, а концентрация вируса очень низка и выявить его традиционными методами достаточно сложно [3].

Хотя МА к BYDV были получены несколькими авторами [4, 5], коммерческие тест-наборы

для определения BYDV, насколько нам известно, не выпускает ни одна европейская фирма, в том числе крупнейший производитель тест-наборов для диагностики фитовирусов на основе поликлональных антител – фирма “Boehringer-Mannheim” (Германия). Между тем существует необходимость удобного метода диагностики для массовых анализов зараженного полевого материала.

Цель настоящей работы – получить и охарактеризовать МА к BYDV и создать на их основе иммуноферментную тест-систему для определения вируса в растительном материале.

BYDV выделяли по методике, принятой в НИИ фитопатологии [6]. Очищенные препараты вируса и зараженный полевой материал были любезно предоставлены ст. науч. сотр. Т.Б. Кастальевой (НИИ фитопатологии). В результате одной процедуры выделения из 1 кг растительного материала обычно получали 70 - 200 мкг вирусного препарата с концентрацией 90 - 250 мкг в 1 мл. В процессе работы были использованы различные препараты BYDV, полученные из полевого материала, собранного в Московской области. Для иммунизации и получения МА использовали препарат из полевого материала 1992 г., в дальнейшем названный “Учхоз-92”. При разработке окончательного варианта тест-системы использовали

Принятые сокращения: МА – моноклональные антитела, ИФА – иммуноферментный анализ, БСА – бычий сывороточный альбумин, КЖ – культуральная жидкость, ПХ – пероксидаза хрена, ФСБ – фосфатно-солевой буфер (0.1 М фосфатный буфер, 0.15 М NaCl, pH 7.2 - 7.4), BYDV – вирус желтой карликовости ячменя.



УДК 578.85/86.083.3

## МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА К ВИРУСУ ЖЕЛТОЙ КАРЛИКОВОСТИ ЯЧМЕНЯ. ИММУНОФЕРМЕНТНАЯ ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ВИРУСА

© 1995 г. Т. Н. Ерохина

*Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,  
117871, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10*

Поступила в редакцию 26.04.94 г.

Получено пять стабильных линий гибридом, продуцирующих моноклональные антитела к вирусу желтой карликовости ячменя (Barley yellow dwarf virus). Пять моноклональных антител выделены из асцитных или культуральных жидкостей и охарактеризованы. Все моноклональные антитела принадлежат к классу IgG и имеют высокие константы связывания с антигеном ( $8.8 \times 10^8 - 1.1 \times 10^{12} \text{ M}^{-1}$ ). Антитела 4В5 отобраны для использования в моноклональной тест-системе. Антитела 1D2 и 3С3 различают два изолята вируса желтой карликовости ячменя, выделенные из полевого материала в 1992 и 1993 гг. Минимальная концентрация вируса, определяемая в очищенном препарате, составила 7 - 8 нг/мл. Проведено определение вируса в экстрактах овса и ячменя из разных регионов России. Моноклональная тест-система позволяет выявлять вирус желтой карликовости ячменя в экстрактах до разведения 1 : 128. Ни одно из полученных антител не взаимодействует с четырьмя различными изолятами вируса скручивания листьев картофеля, также относящегося к лютеовирусам.

*Ключевые слова: вирус желтой карликовости ячменя, моноклональные антитела, иммуноферментная тест-система.*

Вирус желтой карликовости ячменя (BYDV) – типичный представитель группы лютеовирусов. Это изометрический вирус с размером частиц 22 - 30 нм, содержащий однонитевую РНК с  $M 2.0 \times 10^6$ . Он вызывает одно из самых распространенных заболеваний злаков в мире и является причиной значительного снижения урожайности злаковых культур. В тканях растения вирус накапливается только во флоэме в очень низких концентрациях [1]. Вирус переносится на растения тлей. Известно пять штаммов BYDV (PAV, MAV, RPV, SGV и RMV), которые различаются по виду переносящей их тли и способу переноса, а также имеют серологические различия [2]. Диагностика вируса в зараженных растениях всегда была трудной задачей, так как заболевание часто бессимптомно, а концентрация вируса очень низка и выявить его традиционными методами достаточно сложно [3].

Хотя МА к BYDV были получены несколькими авторами [4, 5], коммерческие тест-наборы

для определения BYDV, насколько нам известно, не выпускает ни одна европейская фирма, в том числе крупнейший производитель тест-наборов для диагностики фитовирусов на основе поликлональных антител – фирма “Boehringer-Mannheim” (Германия). Между тем существует необходимость удобного метода диагностики для массовых анализов зараженного полевого материала.

Цель настоящей работы – получить и охарактеризовать МА к BYDV и создать на их основе иммуноферментную тест-систему для определения вируса в растительном материале.

BYDV выделяли по методике, принятой в НИИ фитопатологии [6]. Очищенные препараты вируса и зараженный полевой материал были любезно предоставлены ст. науч. сотр. Т.Б. Кастальевой (НИИ фитопатологии). В результате одной процедуры выделения из 1 кг растительного материала обычно получали 70 - 200 мкг вирусного препарата с концентрацией 90 - 250 мкг в 1 мл. В процессе работы были использованы различные препараты BYDV, полученные из полевого материала, собранного в Московской области. Для иммунизации и получения МА использовали препарат из полевого материала 1992 г., в дальнейшем названный “Учхоз-92”. При разработке окончательного варианта тест-системы использовали

Принятые сокращения: МА – моноклональные антитела, ИФА – иммуноферментный анализ, БСА – бычий сывороточный альбумин, КЖ – культуральная жидкость, ПХ – пероксидаза хрена, ФСБ – фосфатно-солевой буфер (0.1 M фосфатный буфер, 0.15 M NaCl, pH 7.2 - 7.4), BYDV – вирус желтой карликовости ячменя.

препарат из полевого материала 1993 г. – “Немчиновка-93”.

К какому из штаммов BYDV относятся используемые препараты, можно выяснить только с помощью опытов по искусственному заражению растений в теплице разными видами тлей-переносчиков. Поликлональные сыворотки кролика, полученные к одному из штаммов BYDV, в некоторых случаях перекрестно реагируют с другими штаммами [1, 7], поэтому с ее помощью нельзя однозначно определить, к какому штамму относится данный препарат BYDV. Однако мы располагаем рядом косвенных доказательств того, что данные препараты содержат BYDV-PAV (или смесь штаммов PAV и MAV). Во-первых, в момент сбора полевого материала в 1992 и 1993 гг. на посевах злаков были обнаружены только тли видов *Rhopalosiphum padi* (переносит штаммы PAV и RPV) и *Macrosiphum avenae* (переносит штаммы MAV и PAV). Во-вторых, опыты с препаратом штамма RPV, любезно предоставленным ст. науч. сотр. В.С. Обручковым (Всероссийский институт защиты растений), показали, что ни одно из пяти полученных нами МА не взаимодействует с RPV-BYDV. Эти результаты хорошо согласуются с данными других авторов [1] об отсутствии перекрестных реакций поликлональных сывороток, полученных к вирусам штаммов к PAV и MAV, с сыворотками, полученными к RPV.

Так как выход BYDV при выделении чрезвычайно низок (см. выше), для иммунизации мышей использовали минимальное количество антигена (10 - 15 мкг для одной инъекции). Титр иммунной сыворотки составлял  $(1.0 - 1.5) \times 10^5$ . После определения титра делали бустерную иммунизацию – 10 - 15 мкг антигена без адъюванта внутривенно.

Первичный отбор клонов-продуцентов МА проводили методом твердофазного ИФА, при котором антиген сорбировали непосредственно на плашку. Этим методом было отобрано пять положительных клонов, продуцирующих МА к BYDV: 3С3 и 4В5 (получены от миеломной линии Р3Х63.Аг.8.653), 1D2, 3С2 и 1С5 (от миеломной линии Раі). Из табл. 1 видно, что титр КЖ несколько выше у клонов, полученных от линий Р3Х63.Аг.8.653, хотя эти клоны характеризовались более медленным ростом в культуре, чем клоны, полученные от линии Раі (данные не представлены).

Все МА имели высокое сродство к антигену ( $K_a$   $8.8 \times 10^8 - 1.1 \times 10^{12} M^{-1}$ ), что подтверждает высокую специфичность антител, и относились к классу IgG.

МА выделяли из асцитных и культуральных жидкостей. В обоих случаях фракцию иммуноглобулинов сначала осаждали сульфатом аммония, а затем хроматографировали на белок-А-се-

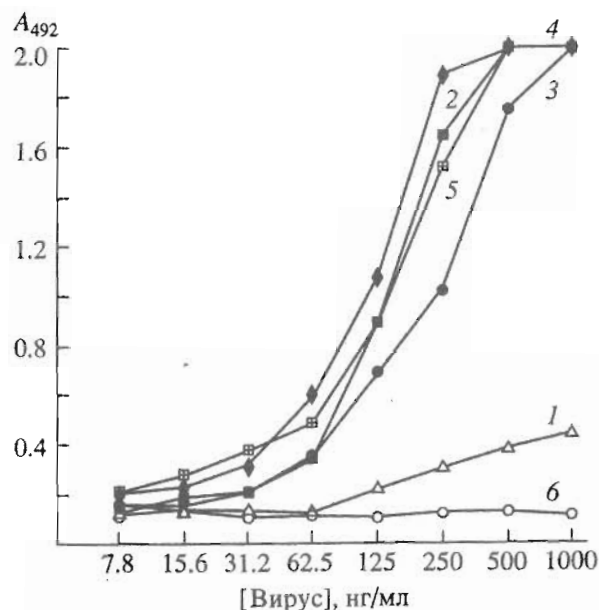


Рис. 1. Определение BYDV (изолят “Учхоз-92”) методом “сэндвич”-ИФА. В подложке МА 3С3 (1), 1D2 (2), 3С2 (3), 1С5 (4), 4В5 (5). Конъюгат – 4В5-ПХ. Контрольная кривая с вирусом мозаики резухи (6).

фарозе. Выход МА в среднем составлял 3 - 5 мг/л КЖ и 4 - 6 мг/мл асцита.

МА 4В5 конъюгировали с пероксидазой хрена и провели определение BYDV в препарате “Учхоз-92” с использованием различных антител методом “сэндвич”-ИФА (рис. 1). МА 3С3 в этом варианте ИФА очень слабо работали в качестве “нижних” антител. Четыре других МА работали в подложке примерно одинаково: минимальная определяемая концентрация BYDV колебалась в пределах 15 - 60 нг/мл.

Однако при попытке диагностики вируса в соке больных растений оказалось, что в подложке работают два антитела: 4В5 и 3С3. Другие три МА не работали или работали очень слабо. Можно предположить, что эти антитела в очищенном

Таблица 1. Некоторые характеристики МА к BYDV (изолят “Учхоз-92”)

| Название клона | Получен от миеломной линии | Класс и подкласс | Титр МА в КЖ ( $\times 10^{-4}$ ) | $K_a, M^{-1}$        |
|----------------|----------------------------|------------------|-----------------------------------|----------------------|
| 1С5            | Раі                        | IgG2a            | 0.25                              | $1.6 \times 10^{11}$ |
| 3С2            | Раі                        | IgG2a            | 2.0                               | н. о.*               |
| 1D2            | Раі                        | IgG3             | 2.0                               | $1.1 \times 10^{12}$ |
| 4В5            | Р3Х63.Аг.8.653             | IgG2b            | 4.0                               | $1.5 \times 10^{11}$ |
| 3С3            | Р3Х63.Аг.8.653             | IgG2a            | 4.0                               | $8.8 \times 10^8$    |

\* н. о. – не определяли.

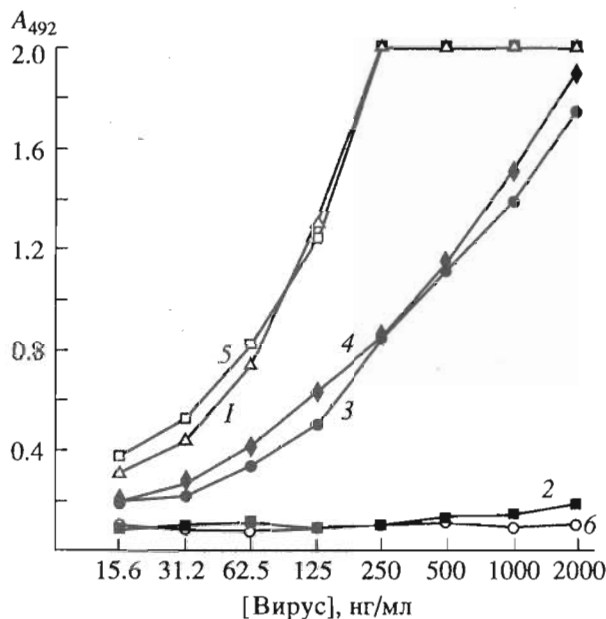


Рис. 2. Определение ВУДВ (изолят "Немчиновка-93") методом "сэндвич"-ИФА. В подложке МА 3С3 (1), 1D2 (2), 3С2 (3), 1С5 (4), 4В5 (5). Конъюгат – 4В5-ПХ. Контрольная кривая с вирусом мозаики резухи (6).

препарате взаимодействуют с антигенными детерминантами, которые не проявляются в нативном вирусном белке.

Для повышения чувствительности определения ВУДВ в полевом материале была несколько изменена методика получения растительного экстракта: перед измельчением растительный материал обрабатывали жидким азотом и инкубировали в экстрагирующем буфере (0.1 М фосфатный буфер, pH 7.0) 30 мин при 20°C. В результате этого чувствительность определения повысилась до разведения экстракта 1 : 128 по сравнению с 1 : 8 - 1 : 16 (без обработки жидким азотом).

Таблица 2. Сравнительный анализ изолятов ВУДВ "Учхоз-92" и "Немчиновка-93" методами непрямого ИФА (I) и прямого "сэндвич"-ИФА (конъюгат 4В5-ПХ) (II)

| Название МА | Минимальная определяемая концентрация вируса, нг/мл |         |                 |             |
|-------------|---|---------|-----------------|-------------|
|             | "Учхоз-92"  |         | "Немчиновка-93" |             |
|             | I   | II      | I               | II          |
| 4В5         | 15 - 30   | 15      | 125             | 7 - 8       |
| 3С3         | 15 - 30   | 250     | 60 - 120        | 7 - 8       |
| 1D2         | 10 - 12   | 30 - 40 | 500             | Не работает |
| 1С5         | 60 - 70   | 15 - 30 | 250             | 15 - 30     |
| 3С2         | 30 - 60   | 40 - 50 | 500             | 30 - 40     |

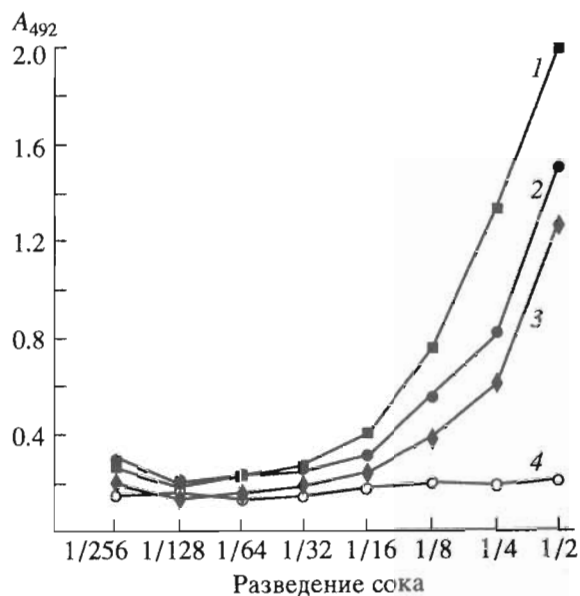


Рис. 3. Определение ВУДВ в экстракте из листьев овса методом "сэндвич"-ИФА. В подложке МА 4В5. Конъюгаты – 4В5-ПХ (1), 3С3-ПХ (2), 1D2-ПХ (3). Контрольная кривая с экстрактом из листьев здорового овса (4).

Дальнейшие исследования проводили с препаратом вируса "Немчиновка-93". Из табл. 2 видно, что есть существенные различия во взаимодействии некоторых антител с изолятами 1992 и 1993 гг. Антитела 1D2 не взаимодействуют с изолятом "Немчиновка-93" в качестве "нижних" антител в "сэндвич"-ИФА и очень слабо реагируют в непрямом ИФА. Однако в составе конъюгата с пероксидазой антитела 1D2 работают с этим препаратом ВУДВ. Антитела 3С3, наоборот, слабо реагируют в подложке с изолятом "Учхоз-92" и очень хорошо – с изолятом "Немчиновка-93". Таким образом, эти антитела различают два изолята вируса. МА 1С5 и 3С2 фактически одинаково работают с обоими изолятами ВУДВ в "сэндвич"-ИФА. Результаты определения ВУДВ (изолят "Немчиновка-93") методом "сэндвич"-ИФА с конъюгатом 4В5-ПХ представлены на рис. 2. Антитела 4В5 и 3С3 показали наибольшую чувствительность – 7 - 8 нг/мл.

Было проведено определение ВУДВ в 13 образцах зеленого материала (овес и ячмень), собранных в Московской, Тамбовской, Калужской и Белгородской областях в 1993 г. С четырьмя образцами был получен положительный результат ( $A_{492}$  составляла 0.44 - 1.70 ОЕ при уровне фоновой реакции 0.1 - 0.2 ОЕ). Результаты эксперимента с образцом овса № 7 из Московской области представлены на рис. 3.

В этих опытах в качестве "верхних" антител использовали МА 4В5, 3С3 и 1D2, конъюгированные с пероксидазой, и МА 4В5 в подложке. ВУДВ

определялся в экстракте до разведения 1 : 16, что вызвано очень низким содержанием вируса в тканях растения. В образцах ячменя из Московской области вирус обнаруживался до разведения экстракта 1 : 128.

Из полученных экспериментальных данных нами был сделан вывод, что единственные антитела, работающие во всех опробованных вариантах ИФА с обоими изолятами вируса, – это 4В5. Мы предполагаем, что МА 4В5 специфичны к РAV-BYDV. Именно они отобраны для использования в моноклональной иммуноферментной тест-системе. МА 3С3 работают так же хорошо, как и 4В5, с изолятом “Немчиновка-93”. Другие полученные моноклональные антитела можно использовать для изучения антигенной структуры вирусного белка и выявления серологических различий между изолятами вируса.

“Сэндвич”-ИФА с четырьмя изолятами вируса скручивания листьев (“Невский”, “Ашерслебен”, “Приор” и “Укана”) показал, что ни одно из пяти МА к BYDV не реагирует с этим вирусом, относящимся к той же группе лютеовирусов, что и BYDV. Этот результат подтверждает специфичность взаимодействия МА с BYDV.

Разработанная иммуноферментная тест-система прошла биологические испытания в НИИ фитовирусологии.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали среду RPMI-1640, 50-кратные растворы селективных сред NAT и NT, эмбриональную сыворотку телят (Gibco, Англия), ПЭГ-1500, диметилсульфоксид (Merck, Германия), пероксидазу из корней хрена (Grad I; Voehringer-Mannheim, Германия), диагностический набор для определения подклассов антител (Calbiochem, США), 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, Твин-20, компоненты буферных растворов (Serva, Германия).

**Иммунизация.** 15 - 20 мкг BYDV вводили в смеси с равным объемом адьюванта Фрейнда – первый раз с полным, второй раз с неполным. Через 2 нед после второй иммунизации 10 - 15 мкг антигена вводили в хвостовую вену. Еще через 2 нед брали сыворотку из хвостовой вены для определения титра. Бустерную иммунизацию (10 - 15 мкг антигена) проводили внутрибрюшинно за 3 сут до гибридизации.

Определение титра антисыворотки проводили методом непрямого ИФА. Сыворотку титровали от разведения 1 : 100 в ФСБ. За титр принимали

разведение сыворотки, при котором  $A_{492}$  была в 2 раза выше уровня фоновой реакции.

**Получение моноклональных антител к BYDV.** Спленоциты иммунной мыши сливали с помощью ПЭГ-1500 с миеломными клетками линий Ра1 или РЗХ63. Ag.8.653 в соотношении 1 : 1 по методу Келера и Мильштайна [8].

Клонирование и реклонирование гибридом проводили методом лимитирующих разведений так, как описано в работе [9].

**Клоны тестировали** методом непрямого ИФА. В лунки планшета вносили BYDV в концентрации 2 мкг/мл и инкубировали при 4°C в течение ночи. Затем последовательно вносили 1% раствор БСА в ФСБ, вирусный препарат в концентрации 2 мкг/мл и тестируемую КЖ. В качестве проявляющих использовали кроличьи антимышинные антитела, конъюгированные с пероксидазой, в рабочем разведении, в качестве субстрата – о-фенилендиамин. Оптическое поглощение измеряли с помощью сканирующего спектрофотометра Titertek Multiskan (Flow, Англия) при длине волны 492 нм.

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

**МА в препаративных количествах** выделяли из асцитной и культуральной жидкостей способом, описанным в работе [9].

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

**Константу связывания МА с антигеном ( $K_a$ )** определяли с помощью неконкурентного ИФА [10].

Конъюгаты МА с пероксидазой получали так, как описано в работе [9].

**Получение растительных экстрактов.** Листья зараженных растений погружали в жидкий азот, затем растирали в фарфоровой ступке в 0.1 М фосфатном буфере (рН 7.0) в соотношении 1 : 5 (вес растения (г) к объему буфера (мл)).

**BYDV определяли** с помощью разработанной тест-системы методом “сэндвич”-ИФА. Последовательность операций:

- сенсibilизация твердой фазы одним из клонов в концентрации 5 мкг/мл в 50 мкл ФСБ и инкубация в течение ночи при 4°C;
- внесение 1% раствора БСА в ФСБ и инкубация при 20°C (1 ч);
- внесение 50 мкл вирусодержащего материала последовательно разбавленного ФСБ, содержащим 0.05% Твин-20 (ФСБ–Твин), и инкубация при 20°C (2 ч);

– внесение 50 мкл МА, конъюгированных с пероксидазой, в ФСБ–Твин в рабочем разведении и инкубация при 20°C (1 ч);

– внесение 50 мкл субстратной смеси (0.1 М цитратный буфер, рН 5.0, с 0.06 об. % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) и инкубация при 20°C (10 - 15 мин);

– остановка реакции внесением 50 мкл 1 н. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Между стадиями планшеты промывали по 3 раза раствором ФСБ–Твин. Результаты представляли в виде зависимости величины оптического поглощения образовавшегося продукта ферментативной реакции от концентрации антигена в пробах (кривые титрования). За чувствительность метода принимали концентрацию антигена (или разведение анализируемого растительного экстракта), при которой величина A<sub>492</sub> в 2 раза превышает поглощение в контрольной пробе. В качестве контроля при тестировании вируса использовали препарат вируса мозаики резухи, а также экстракт из листьев здоровых растений.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Rochow W.F., Duffus J.E.* // Handbook of Plant Virus Infections and Comparative Diagnosis / Ed. Kurstak E. Amsterdam: Elsevier North Holland, 1981. P. 147 - 170.
2. *Fargette D., Lister R.M., Hood E.I.* // Plant Dis. 1982. V. 66. P. 1041 - 1045.
3. *Brakke M.K., Rochow W.F.* // Virology. 1974. V. 61. P. 240 - 248.
4. *Hsu H.T., Aebig J., Rochow W.F.* // Phytopathology. 1984. V. 74. P. 600 - 605.
5. *Pead M.T., Torrance L.* // Ann. Appl. Biol. 1988. V. 113. № 3. P. 639 - 644.
6. *Hammond J., Lister R.M., Foster J.E.* // J. Gen. Virol. 1983. V. 64. P. 667 - 676.
7. *Murphy J.F., D'Arcy C.J.* // J. Virol. Meth. 1991. V. 31. P. 263 - 272.
8. *Kohler G., Milstein C.* // Nature. 1975. № 256. P. 495 - 497.
9. *Плечко Т.Н., Кириллов А.В., Амбросова С.М., Борисова О.Б., Одинец А.Г.* // Биооргани. химия. 1991. Т. 17. № 2. С. 223 - 231.
10. *Beatty J.D., Beatty G.B., Vlahos W.C.* // J. Immunol. Meth. 1987. V. 100. № 1. P. 173 - 179.

## Monoclonal Antibodies to Barley Yellow Dwarf Virus: A Immunoenzyme Test-System for Virus Diagnosis

T. N. Erokhina

*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,  
ul. Mikiukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117871 Russia*

**Abstract** – Five stable hybridoma cell lines producing monoclonal antibodies to barley yellow dwarf virus were obtained. Five monoclonal antibodies, isolated from ascitic and cultural fluids and characterized, belong to the IgG class and have high constants of the antigen binding ( $8.8 \times 10^8 - 1.1 \times 10^{12} \text{ M}^{-1}$ ). Antibodies 4B5 were selected for the use in a monoclonal test-system. Antibodies 1D2 and 3C3 distinguished between two isolates of barley yellow dwarf virus from the field samples collected in 1992 and 1993. The minimum detectable virus concentration in the purified preparation was estimated as 7 to 8 ng/ml. Virus identification in extracts of oat and barley from various regions of Russia was carried out. The monoclonal test-system permits detection of barley yellow dwarf virus in extracts diluted up to 1 : 128. None of the obtained antibodies interacted with four different isolates of potato leafroll virus, which also belongs to luteoviruses.

**Key words:** *barley yellow dwarf virus, monoclonal antibodies, immunoenzyme test-system.*