



УДК 578.837.1.083.3

МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА К ВИРУСУ СКРУЧИВАНИЯ ЛИСТЬЕВ КАРТОФЕЛЯ И ИХ ИММУНОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА

© 1996 г. С. М. Амбросова[#], Ю. С. Малофеева, Ю. А. Варицев**Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10;*** ВНИИ картофельного хозяйства МСХ РФ, пос. Коренево Московской обл.*

Поступила в редакцию 22.03.95 г.

Получено и охарактеризовано шесть гибридных линий, продуцирующих моноклональные антитела к вирусу скручивания листьев картофеля (PLRV). Все антитела относятся к классу IgG и имеют высокие константы связывания с антигеном $(0.5 - 6.4) \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$. На белковой оболочке вируса методом конкурентного иммуноферментного анализа выявлены три области связывания антител с антигеном. Изучена стабильность эпитопов в прямом иммуноферментном анализе при различных условиях сорбции вируса. Исследована специфичность взаимодействия антител с 5 изолятами PLRV и гетерологичным лютеовирусом – вирусом желтой карликовости ячменя (BYDV). На основе моноклональных антител разработана диагностическая тест-система, позволяющая определить до 10 - 15 нг вируса в 1 мл.

Ключевые слова: моноклональные антитела; вирус; эпитоп; изолят; тест-система; иммуноферментный анализ.

Вирус скручивания листьев картофеля (Potato leafroll virus – PLRV) – возбудитель одного из наиболее вредоносных и распространенных заболеваний этой культуры. Потери урожая от вируса часто достигают 70%. При этом значительно снижается качество клубней и уменьшается содержание в них крахмала [1]. Наряду с Y-вирусом картофеля PLRV – главная причина вырождения этой экономически важной культуры.

PLRV имеет изометрические вирионы диаметром около 24 нм, состоящие из примерно 5900 нуклеотидов одноцепочечной РНК и 180 идентичных белковых субъединиц с молекулярной массой около 24 кДа [2, 3]. Геном PLRV включает шесть основных открытых рамок считывания (ОРС), из которых ОРС-3 идентифицирована как ген белка оболочки [3, 4].

PLRV является типичным флэмоограниченным лютеовирусом, накапливающимся в растениях в крайне низких концентрациях. Выход вируса при очистке не превышает 1 мг/кг листового материала, вследствие чего, несмотря на значительное усовершенствование методики очистки,

невозможно получить препараты, свободные от примесей компонентов растений-накопителей [5]. Поэтому традиционные антисыворотки, получаемые на кроликах, показывают высокий уровень фоновых реакций в ИФА, особенно на клубневом материале.

Проблема устранения неспецифических реакций ИФА для ряда вирусов растений была решена с получением МА к этим вирусам [6]. При этом в ряде случаев вирусспецифичные МА к PLRV превосходят ПА по эффективности связывания с эпитопами вирусного белка [7].

Целью наших исследований было получение и иммунохимическая характеристика МА, пригодных для иммуноанализа PLRV.

В качестве антигена использовали очищенный препарат высокоиммуногенного штамма PLRV-26V, выделенный во ВНИИ картофельного хозяйства МСХ РФ. Из 60 полученных гибридных клонов для дальнейшей работы было отобрано 6 стабильных клонов, некоторые характеристики которых приведены в табл. 1.

Эпитопную специфичность МА изучали методом, основанным на конкуренции за центр связывания с эпитопом на белковой оболочке вируса свободных и меченных ферментом МА. С этой целью в лунки 96-луночных планшетов, sensibilizированных кроличьей поликлональной сывороткой к PLRV, вносили препарат вируса и

Принятые сокращения: PLRV – вирус скручивания листьев картофеля; МА и ПА – моно- и поликлональные антитела, ФСБ – фосфатно-солевой буфер (0.1 М фосфатный буфер, 0.15 М NaCl, pH 7.2 - 7.4), ПХ – пероксидаза хрена, БСА – бычий сывороточный альбумин.

[#] Автор для переписки.

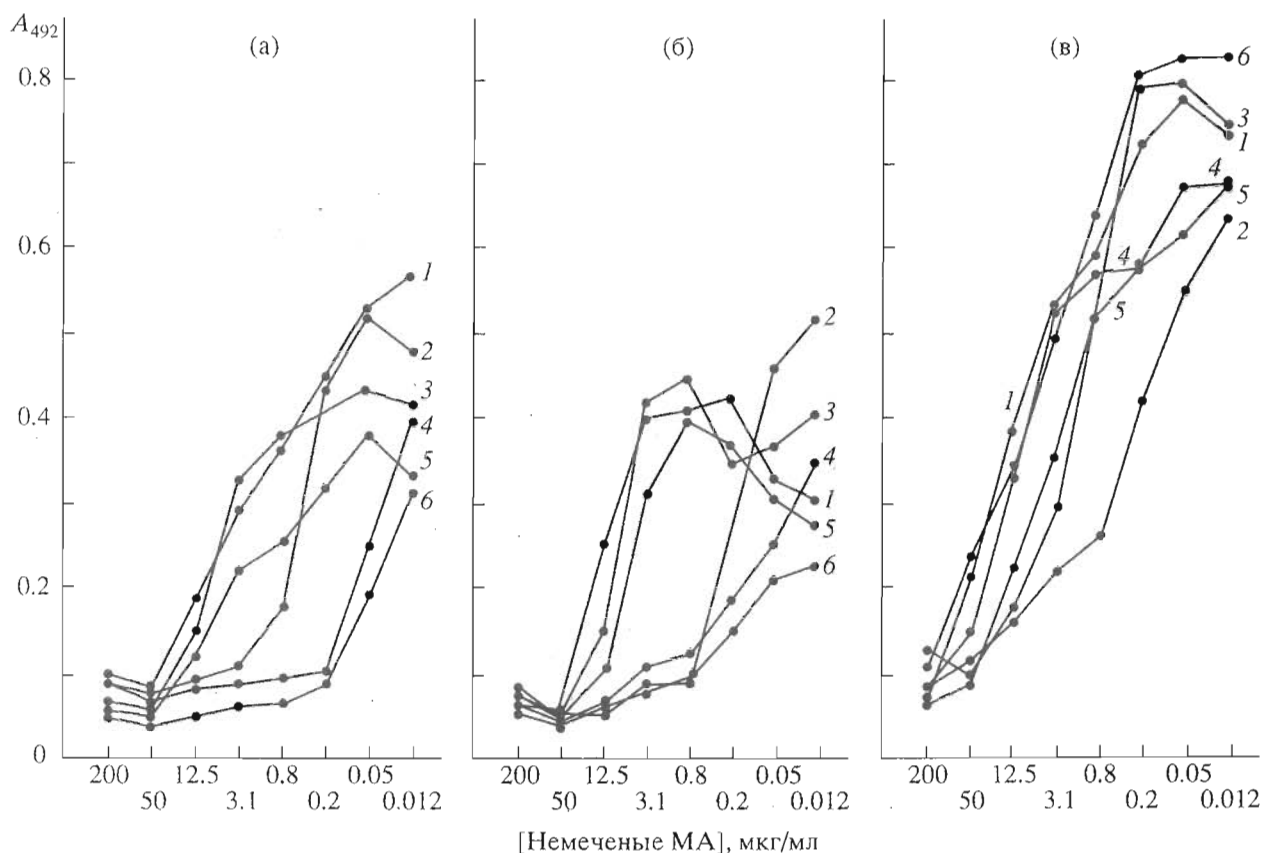


Рис. 1. Кривые титрования PLRV методом конкурентного ИФА. Блокирующие антитела – L1.5 (1), L1.3 (2), L3.2 (3), L2.4 (4), L4.3 (5), L4.4 (6). Конъюгаты – L2.4-ПХ (а), L4.3-ПХ (б), L1.3-ПХ (в).

инкубировали в присутствии свободных МА в различных концентрациях, после чего без отмывки вносили конъюгат МА с пероксидазой в рабочем разведении (рис. 1). Если два эпитопа, к которым направлены свободные и меченые МА, в той или иной степени перекрываются или совпадают, то количество связавшегося с антигеном конъюгата резко уменьшается по мере увеличения количества немеченых блокирующих антител. Из анализа кривых следует, что МА L4.4 при достаточно низких концентрациях (0.8 - 3.0 мкг/мл)

практически полностью блокируют присоединение к вирусу конъюгатов L2.4-ПХ и L4.3-ПХ, а МА L2.4 и L1.3 – только конъюгата L4.3-ПХ. Количество связавшегося с PLRV конъюгата L1.3-ПХ уменьшается лишь при высоких концентрациях свободных МА (50 - 200 мкг/мл). Эпитопная специфичность конъюгированных с пероксидазой МА L2.4, L4.3 и L1.3 и свободных МА L3.2 и L1.5, по всей вероятности, различна, так как во всех случаях реакция ингибируется только при высоких концентрациях свободных антител.

Таблица 1. Свойства МА, взаимодействующих с PLRV

Клон	Класс	$K_d \times 10^{-10}, M^{-1}$	Титр МА в жидкости		Конкуренция* с конъюгатами		
			культуральной	асцитной	L2.4-ПХ	L4.3-ПХ	L1.3-ПХ
L1.3	IgG	0.52	1×10^3	5×10^4	±	+	+
L2.4	IgG	1.20	5×10^2	5×10^4	+	+	-
L3.2	IgG	1.90	2×10^2	1×10^6	-	-	-
L4.3	IgG	0.50	1×10^3	2×10^4	-	+	-
L1.5	IgG	0.23	5×10^2	1×10^6	-	-	-
L4.4	IgG	6.40	1×10^4	2×10^3	+	+	-

* Есть конкуренция (+), нет конкуренции (-), частичная конкуренция (±).

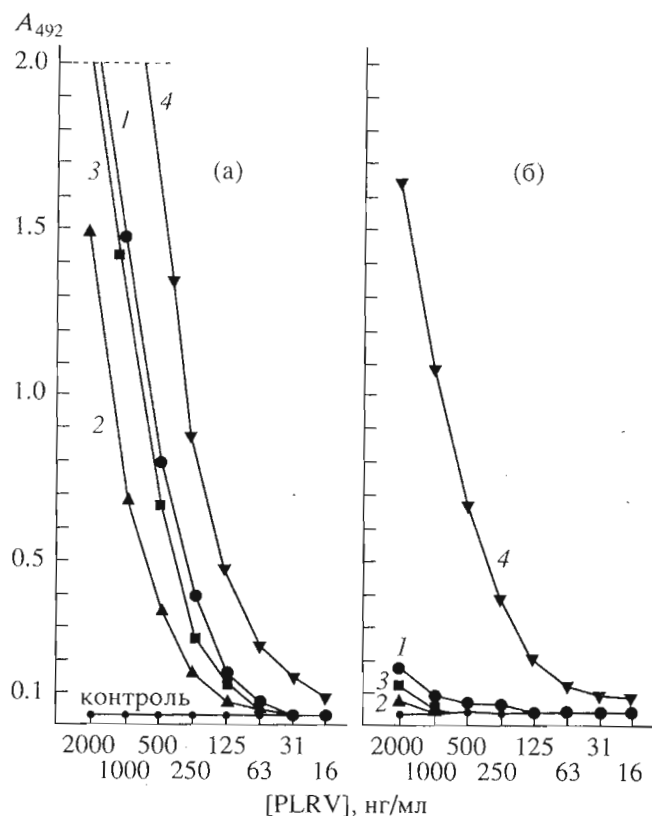


Рис. 2. Определение PLRV в прямом ИФА при сорбции вируса в условиях pH 7.4 (а) и 9.6 (б). Конъюгаты – L2.4-ПХ (1), L1.3-ПХ (2), L4.3-ПХ (3), ПА-ПХ (4).

Таким образом, на белковой оболочке PLRV можно выделить по крайней мере три участка связывания МА: эпитопы, соответствующие МА L3.2 и L1.5, а также область, где локализованы стерически сближенные эпитопы МА L4.4, L4.3 и L2.4 и, возможно, эпитоп МА L1.5, частично перекрывающийся с участком связывания МА L2.4.

Таблица 2. Характеристика взаимодействия анти-PLRV-МА с различными изолятами PLRV и BYDV в непрямом “сэндвич”-ИФА*

Клон	PLRV					BYDV
	26V	Невский	Ашерслебен	Приор	Укама	Учхоз-92
L1.3	1.349	1.003	0.270	0.872	0.635	0.070
L4.4	1.066	1.017	0.287	0.616	0.639	0.050
L2.4	1.293	0.935	0.449	0.626	0.746	0.060
L1.5	1.166	0.909	0.239	0.260	0.305	0.080
L3.2	1.406	1.223	0.417	0.738	0.940	0.070
L4.3	1.241	0.976	0.239	0.260	0.305	0.060

* Приведены значения A_{492} .

Изучена стабильность эпитопов в прямом ИФА при различных условиях сорбции вируса (рис. 2). Показано, что эпитопы, соответствующие МА L1.3, L2.4 и L4.3, частично или полностью деградируют в щелочной среде и, по-видимому, являются неотопами (конформационно-зависимыми эпитопами). Авторами работы [8] на белке оболочки PLRV было выявлено 10 эпитопов, из которых один был отнесен к метатопам, 6 – к не деградирующим и 3 – к деградирующим в щелочной среде неотопам.

Изучение антигенной специфичности полученных МА проводили с пятью изолятами PLRV, полученными из разных регионов (Россия – 26V и Невский; Германия – Ашерслебен; Болгария – Укама и Приор), а также с вирусом желтой карликовости ячменя (BYDV) (изолят Учхоз-92), также относящимся к лютеовирусам.

Результаты определения вирусов методом непрямого “сэндвич”-ИФА представлены в табл. 2. Наиболее широким спектром взаимодействия обладали МА L2.4 и L3.2 (A_{492} составляла 0.41 - 1.40 при уровне фоновой реакции 0.05 - 0.10). Остальные МА значительно слабее взаимодействовали с изолятом Ашерслебен. Экспериментальные данные позволяют предположить, что полученные МА, по-видимому, вируссpezifичны и направлены к эпитопам, присутствующим у всех исследованных изолятов, и в то же время не реагируют с группоспецифическими эпитопами лютеовирусов, о наличии которых на белке оболочки BYDV сообщалось другими исследователями [7, 8].

На основании изложенных данных была предпринята попытка создания тест-системы на основе МА для диагностики PLRV. Тестирование проводили на очищенном препарате PLRV-26V с использованием прямого “сэндвич”-ИФА. Для сенсibilизации планшетов применяли МА L2.4, а в качестве проявляющих антител – конъюгаты

МА L1.3, L2.4, L4.3, а также ПА с пероксидазой. Предварительные результаты показали, что для определения PLRV наиболее пригодна тест-система на основе МА L2.4, позволяющая выявлять до 10 - 15 нг/мл вируса (рис. 3).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали среды DMEM, NAT-DMEM, NT-DMEM, телячью эмбриональную сыворотку (Gibco, Англия), адъювант Фрейнда (Calbiochem, США), кроличьи поликлональные антитела к PLRV (Биотехнологический центр ВНИИКХ), кроличьи антимишшине антитела, конъюгированные с пероксидазой (ДАКО-Immunoglobulins, Дания), пероксидазу хрена (Boehringer-Mannheim, Германия), орто-фенилендиамин, Твин-20 (Sigma, США), ПЭГ-1500, диметилсульфоксид (Merck, ФРГ), бычий сывороточный альбумин (Seriva, Германия), белок-А-сефарозу (Pharmacia, Швеция), 96-луночные планшеты для иммуноанализа (NUNC, Дания), 24- и 96-луночные планшеты для культур клеток (Linbro, Flow Lab, Англия).

Для иммунизации мышей линии BALB/c использовали вирусный препарат PLRV-26V, накопление и выделение которого изложено в работе [9]. Иммунизацию мышей проводили путем 2-кратного внутрибрюшинного введения 50 - 70 мкг очищенного препарата PLRV-26V в полном адъюванте Фрейнда с интервалом в 2 - 3 нед. Затем через 1 - 2 нед внутривенно вводили по 30 - 50 мкг PLRV в фосфатном буфере в течение 3 дней. На 3 - 4-е сут после последней инъекции извлекали селезенку для получения иммунных спленоцитов.

Получение гибридом, продуцирующих МА к PLRV. Спленоциты иммунной мыши сливали с миеломными клетками линии Ра1 в соотношении 1 : 5, используя в качестве сливающего агента ПЭГ-1500. Процедура слияния клеток и клонирования гибридом изложены в работе [10]. После появления клонов (14 - 21 сут) культуральную жидкость тестировали на наличие специфических антител методом непрямого "сэндвич"-ИФА. Первичные гибридомные культуры клонировали не менее 2 раз, отбирая на каждой стадии клоны с наибольшей пролиферативной активностью и устойчивым синтезом специфических антител. Для наработки препаративных количеств МА гибридомы в количестве $(1 - 5) \times 10^6$ клеток вводили мышам линии BALB/c, предварительно сенсibilизированным 0.5 мл пристана или вазелинового масла. Через 2 - 3 нед мышей с выраженным ростом асцитной опухоли забивали и собирали асцитную жидкость. Выделение МА из асцитной жидкости проводили по схеме, изложенной в работе [11].

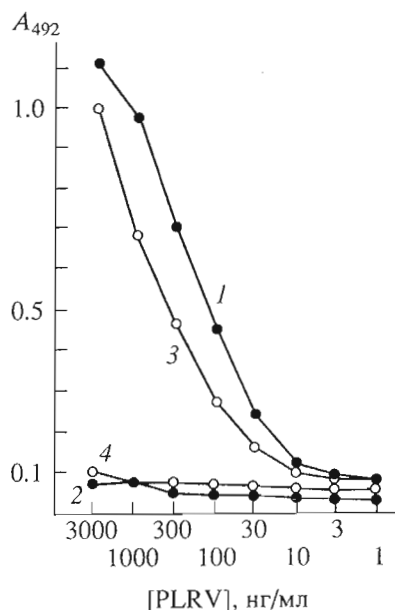


Рис. 3. Определение PLRV в очищенном препарате PLRV-26V методом прямого "сэндвич"-ИФА. Сенсibilизирующие антитела - МА L2.4 (1, 2), ПА (3, 4). Конъюгаты - L2.4-ПХ (1, 2), ПА-ПХ (3, 4). Контроль - с вирусом аспермии томатов (2, 4).

Константу связывания МА с PLRV определяли методом неконкурентного ИФА [12].

Конъюгаты МА с пероксидазой получали по методу, изложенному в работе [10].

Определение специфичности МА

Использовали следующие схемы постановки ИФА:

1. *Непрямой "сэндвич"-ИФА.* В лунки 96-луночных планшетов для ИФА последовательно вносили по 50 мкл:

- раствор кроличьих ПА к PLRV (2 мкг/мл) в 0.01 М карбонатном буфере, pH 9.6 (инкубировали 16 ч при 4°C);

- 1% раствор БСА в ФСБ (инкубировали 30 мин при 20°C);

- раствор PLRV в ФСБ в концентрации 2 мкг/мл (инкубировали 45 мин при 37°C);

- культуральную жидкость или раствор МА (2 мкг/мл), последовательно разведенные в 2 раза ФСБ с 0.05% Твин-20 (инкубировали 1 ч при 37°C);

- раствор кроличьих антител против иммуноглобулинов мыши, конъюгированных с пероксидазой, в рабочем разведении (инкубировали 1 ч при 20°C);

- субстратную смесь (1 мг/мл орто-фенилендиамина в 0.1 М цитратном буфере, pH 5.0, содержащем 0.06% пероксида водорода).

2. Прямой "сэндвич"-ИФА. Лунки 96-луночных планшетов сенсibilизировали 16 ч раствором МА (2 мкг/мл) в карбонатном буфере при 4°C. Затем последовательно вносили по 50 мкл:

– 1% раствор БСА в ФСБ (инкубировали 30 мин при 20°C);

– вирусодержащий материал, последовательно разведенный ФСБ в 2 раза (инкубировали 1 ч при 37°C);

– конъюгат МА с пероксидазой в ФСБ-Твин 20 в рабочем разведении (инкубировали 1 ч при 20°C);

– субстратную смесь.

Между стадиями планшеты промывали 3-4 раза ФСБ-Твин 20. Развитие окраски останавливали добавлением 50 мкл 1 н. H₂SO₄. Оптическое поглощение продукта ферментативной реакции измеряли на спектрофотометре Titertek Multiskan при длине волны 492 нм.

За чувствительность метода принимали концентрацию антигена, при которой величина оптического поглощения в 2 раза превышает таковую в контрольной пробе.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Попкова К.В., Шнейдер Ю.И., Воловик А.С., Шмыгля В.А. // Болезни картофеля. М.: Колос, 1980.
2. Rowhani A., Stace-Smith R. // Virology. 1979. V. 98. P. 45 - 54.
3. Van der Wilk F., Huisman M.J., Cornelissen B.J.C., Huttinga H., Coldbach R. // FEBS Lett. 1989. V. 245. P. 51 - 56.
4. Mayo M.A., Robinson D.J., Jolly C.A., Hyman L. // J. Gen. Virol. 1989. V. 70. P. 1037 - 1051.
5. Clark R.G., Converse R.H., Kojima M. // Plant Dis. 1980. V. 64. P. 43 - 45.
6. Dietzgen R.G., Sander E. // Arch. Virol. 1982. V. 74. P. 197 - 204.
7. Oshima K., Ueda I., Shikata E. // J. Fac. Agr. Hokkaido Univ. 1988. V. 63. Pt. 4. P. 373 - 383.
8. Van den Heuvel J.F.J.M., de Blank R.V., Goldbach R., Peters D. // Arch. Virol. 1990. V. 115. P. 185 - 197.
9. Варицев Ю.А., Новиков В.К., Чугунова Л.В., Варицева Г.П. // Науч. тр. НИИКХ. 1991. Вып. 53. С. 48 - 57.
10. Плечко Т.Н., Кириллов А.В., Амбросова С.М., Борисова О.В., Одинец А.Г. // Биоорган. химия. 1991. Т. 17. С. 223 - 231.
11. Амбросова С.М., Кириллов А.В., Сухачева Е.А., Бобкова А.Ф., Нацвлишвили Н.М., Малофеева Ю.С., Атабеков И.Г. // Биоорган. химия. 1992. Т. 18. С. 1089 - 1097.
12. Beatty J.D., Beatty G.B., Vlahos W.G. // J. Immunol. Methods. 1987. V. 100. P. 173 - 179.

Immunochemical Characterization of Monoclonal Antibodies to Potato Leafroll Virus

S. M. Ambrosova*,¹ Yu. S. Malofeeva*, and Yu. A. Varitsev**

* Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, V-437, GSP-7, 117871 Russia

** All-Russian Research Institute of Potato Growing, Ministry of Agriculture of Russia, pos. Korenevo, Moscow oblast

Abstract—Six hybridoma lines producing monoclonal antibodies to potato leafroll virus (PLRV) were generated and characterized. All antibodies belong to the IgG class and have high antigen binding constants $(0.5-6.4) \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$. Using a competitive immunoassay, three antigen binding sites of the antibodies were identified on the virus coat protein. Stability of epitopes in a direct enzyme immunoassay under different conditions of virus sorption was examined. Specificity of interaction of the antibodies with five PLRV isolates and with a heterologous luteovirus, barley yellow dwarf virus (BYDV) was studied. A diagnostic assay system using monoclonal antibodies was developed, which can detect virus at a concentration of 15 ng per 1 ml.

Key words: monoclonal antibodies, virus, isolate, assay system, enzyme immunoassay.

¹ To whom correspondence should be addressed.