



УДК 578.869.57.083.3

## ИММУНОФЕРМЕНТНАЯ ТЕСТ-СИСТЕМА НА ОСНОВЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВИРУСА НЕКРОТИЧЕСКОГО ПОЖЕЛТЕНИЯ ЖИЛОК ЛИСТЬЕВ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ

© 1996 г. Е. А. Сухачева<sup>#</sup>, Л. П. Козлов\*, Д. Ю. Плаксин\*\*,  
И. С. Павлова, С. М. Амбросова

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,  
117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10;

\* Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, Санкт-Петербург;

\*\* Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения РАН, Пермь

Поступила в редакцию 19.04.95 г.

Получено пять стабильных гибридных линий, продуцирующих моноклональные антитела к вирусу некротического пожелтения жилок листьев сахарной свеклы (Beet necrotic yellow vein virus). Для всех моноклональных антител определен подкласс. Разработана иммуноферментная тест-система для определения вируса в экстрактах листьев зараженных растений. Сравнивали прямой сэндвич-ИФА с применением только моноклональных антител и систему с использованием биотинилированных моноклональных антител и конъюгатов стрептавидина с пероксидазой из хрена или с гомополимером пероксидазы из хрена. Показано, что иммуноферментная диагностическая тест-система на основе моноклональных антител с применением конъюгата стрептавидина с полимерной пероксидазой из хрена обладает максимальной чувствительностью и позволяет определять вирус в экстрактах листьев зараженных растений в разведении до 1/12000.

*Ключевые слова:* вирус некротического пожелтения жилок листьев сахарной свеклы, моноклональные антитела, иммуноферментная тест-система.

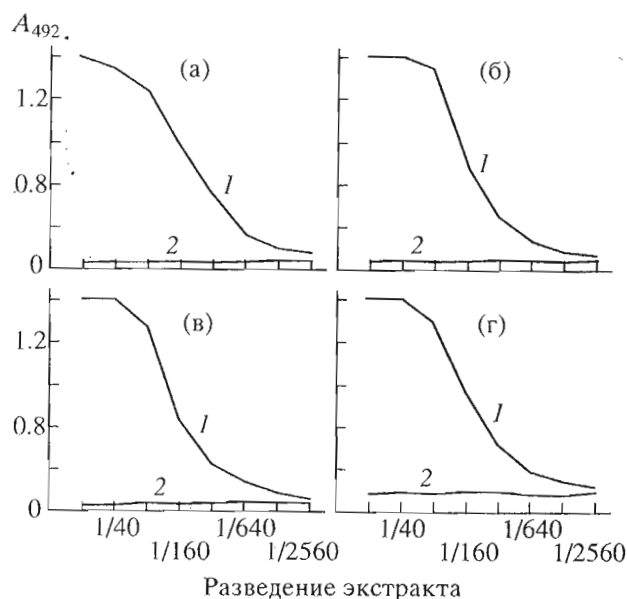
Вирус некротического пожелтения жилок листьев сахарной свеклы (BNYVV) относится к группе фурувирусов. Вызываемая данным вирусом ризомания отмечена в последнее время в значительной части регионов, связанных с выращиванием сахарной свеклы, и на сегодняшний день представляет серьезную проблему. BNYVV переносится сложным путем с участием почвенного гриба *Polymyxa betae*. Данный вирус содержит четыре типа вирионов, инкапсулирующих одноцепочечные молекулы РНК разной длины. Было показано, что по крайней мере одна молекула РНК играет существенную роль в переносе вируса от гриба к корням растения, а другая участвует в дальнейшем распространении заболевания [1].

Сокращения: МА – моноклональные антитела; BNYVV – вирус некротического пожелтения жилок листьев сахарной свеклы; ПХ – пероксидаза из хрена; BSA – бычий сывороточный альбумин; PBS – фосфатно-солевой буфер (0.01 М Na-фосфат, 0.15 М NaCl, pH 7.2); Bi – биотин; НАТ – среда, содержащая  $10^{-4}$  М гипоксантин,  $4 \times 10^{-7}$  М аминоптерин и  $1.6 \times 10^{-5}$  М тимидин; НТ – среда, содержащая  $10^{-4}$  М гипоксантин и  $1.6 \times 10^{-5}$  М тимидин; Стг – стрептавидин.

<sup>#</sup> Автор для переписки.

В последние годы было проведено интенсивное иммунохимическое изучение BNYVV с использованием как поликлональных, так и моноклональных антител [2 - 4]. Для локализации эпитопов на поверхности вириона была использована иммуноэлектронная микроскопия [5], а антигенный анализ белка оболочки вируса был проведен с применением синтетических перекрывающихся пептидов [6].

Наиболее перспективный подход к снижению потерь урожая, обусловленных присутствием BNYVV, заключается в использовании устойчивых сортов, что в свою очередь требует разработки тест-системы для выявления возбудителя заболевания. На сегодняшний день диагностические наборы для обнаружения BNYVV методом ИФА на основе поликлональных антител выпускаются фирмой Boehringer-Mannheim. Максимальная чувствительность коммерческих тест-систем составляет 5 - 10 нг/мл. В России аналогичные диагностикумы не производятся. Значительный экономический ущерб, связанный с распространением ризомании, с одной стороны, и трудности получения достаточного количества высокоочищенного вируса для производства высококачественных



**Рис. 1.** Определение BNYVV в экстрактах листьев зараженных растений с помощью различных вариантов прямого сэндвич-ИФА с использованием конъюгата R4-ПХ (1). Для сенсibilизации твердой фазы использовали МА R1 (а), R3 (б), R4 (в), R5 (г). 2 – отрицательный контроль с экстрактом листьев растений, инфицированных вирусом табачной мозаики.

сывороток – с другой, обусловили необходимость создания тест-системы для диагностики вируса на основе моноклональных антител (МА). Решение этой задачи и явилось целью данной работы.

**Таблица 1.** Некоторые характеристики гибридом, продуцирующих МА к BNYVV

Гибридома	Субкласс иммуноглобулинов	Титр моноклональных антител в жидкости	
		культуральной	асцитной
R1	IgG1	$4 \times 10^3$	$10^5$
R2	IgG2a	$8 \times 10^3$	$10^6$
R3	IgG1	$10^4$	$10^6$
R4	IgG1	$10^4$	$5 \times 10^6$
R5	IgG2a	$10^4$	$5 \times 10^6$

**Таблица 2.** Чувствительность определения BNYVV в различных вариантах прямого сэндвич-ИФА (максимальное разведение экстракта листьев зараженных растений, дающее положительную реакцию)

Сенсibilизирующие МА	Конъюгат		
	R3-ПХ	R4-ПХ	R5-ПХ
R1	1/320	1/1000	1/1000
R2	1/250	1/640	1/320
R3	1/200	1/1000	1/700
R4	1/300	1/1000	1/700
R5	1/200	1/640	1/320

В результате трех независимых гибридизаций было получено 11 клонов, продуцирующих МА к BNYVV. Иммунизацию животных проводили очищенным антигеном BNYVV; на этапе тестирования гибридных клонов в качестве антигена был использован экстракт из листьев зараженных растений. 7 клонов, обладающих наибольшей пролиферативной активностью и максимальным титром антивирусных антител, были отобраны для дальнейшего клонирования. Некоторые характеристики пяти стабильных гибридных линий, полученных после двукратного клонирования, представлены в табл. 1.

При разработке тест-системы для обнаружения BNYVV был использован подход, примененный ранее при создании диагностикума для вируса штриховатой мозаики ячменя [7]. Предварительно были проведены эксперименты по определению оптимальных условий для сорбции МА на твердую фазу. Показано, что наилучшие результаты достигаются при нанесении МА в карбонат-бикарбонатном буфере при pH 9.6; оптимальная концентрация покровных МА составляла 1 - 2 мкг/мл. Затем были испытаны все возможные комбинации пяти сенсibilизирующих и трех детектирующих МА для обнаружения BNYVV методом прямого сэндвич-ИФА (моноклональный сэндвич-ИФА). Установлено, что максимальная чувствительность достигалась в трех вариантах прямого сэндвич-ИФА с использованием конъюгата R4-ПХ и МА R1, R3 или R4 для сенсibilизации твердой фазы (табл. 2). В этом случае BNYVV обнаруживался в экстрактах листьев инфицированных растений в разведении до 1/1000. При этом практически отсутствовала реакция с экстрактами листьев здоровых или инфицированных вирусом табачной мозаики растений (рис. 1а - 1в). Обладая такой же чувствительностью система R1-R5-ПХ оказалась менее пригодной для выявления BNYVV, так как в этом случае наблюдался сравнительно высокий уровень неспецифических реакций (рис. 1г).

Для усиления ферментативного сигнала и повышения чувствительности разрабатываемой тест-системы была использована стрептавидин-биотиновая система. Как известно, биотинилирование антител происходит в мягких условиях и не приводит к нарушению биологических функций макромолекул [8], тогда как введение ферментной метки непосредственно в детектирующие МА зачастую ухудшает способность антител к связыванию с антигеном [9 - 11]. Стрептавидин, имеющий нейтральную изоэлектрическую точку и не несущий углеводных остатков, позволяет существенно уменьшить уровень неспецифических реакций по сравнению с использованием для таких целей авидина. При замене в прямом сэндвич-ИФА конъюгата R4-ПХ на биотинилированные МА R4-Bi с использованием в качестве детектирующего

реагента конъюгата стрептавидина с ПХ чувствительность обнаружения BNYVV увеличилась в 2 раза. Дальнейшее усиление ферментативного сигнала может быть достигнуто при применении стрептавидина, конъюгированного с гомополимером ПХ [12]. Данный способ повышения чувствительности иммуноанализа имеет такие неоспоримые преимущества, как простота постановки реакции, минимальные изменения схемы эксперимента и отсутствие необходимости в дополнительном лабораторном оборудовании. Были использованы конъюгаты стрептавидина с пероксидазой из хрена разной степени полимеризации, включая 20, 40 и 80 (Str-ПХ20, Str-ПХ40 и Str-ПХ80). Показано, что наибольшая чувствительность анализа, в 10 - 12 раз превосходящая чувствительность прямого сэндвич-ИФА, достигается при введении в систему конъюгата Str-ПХ40 (рис. 2). Два других конъюгата, значительно различающиеся по степени полимеризации ПХ, тем не менее дают одинаковое усиление сигнала и повышают чувствительность тест-системы в 5 - 6 раз по сравнению с использованием моноклонального конъюгата. Возможно, это связано с особенностями эпитопной структуры таких сложных в антигенном отношении объектов, как вирусы растений. Предложенный вариант иммунодиагностической тест-системы для выявления BNYVV обладает достаточно высокой чувствительностью и может быть использован для широкомасштабных работ, связанных с диагностикой ризомании.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали среды DMEM, NAT-DMEM, HT-DMEM, телячью эмбриональную сыворотку (Gibco, Англия), адъювант Фрейнда (Calbiochem, США), кроличьи поликлональные антитела к BNYVV (Всероссийский НИИ защиты растений, Санкт-Петербург), кроличьи антимышьи антитела, конъюгированные с пероксидазой из хрена (DAKO-Immunoglobulines, Дания), пероксидазу из хрена (Boehringer-Mannheim, ФРГ), орто-фенилендиамин, пристан, Твин-20, N-оксисукцинимидный эфир аминоксаноилбиотина (Sigma, США), полиэтиленгликоль-1500, диметилсульфоксид (Merck, ФРГ), бычий сывороточный альбумин, Тритон X-100, трис (Serva, ФРГ), белок-A-сефарозу (Pharmacia, Швеция), 96-луночные планшеты для иммуноанализа (Linbro, Flow Lab, Англия), 24- и 96-луночные планшеты для культур клеток (Flow Lab, Англия), конъюгаты стрептавидина с полимерной пероксидазой из хрена (SDT Inc., Россия).

**Накопление и выделение BNYVV.** Для получения МА был использован изолят К-88, выделенный из почвенных образцов Киргизии. Чистоту изолятов проверяли на различных индикаторах, имеющих целью ловить возможную

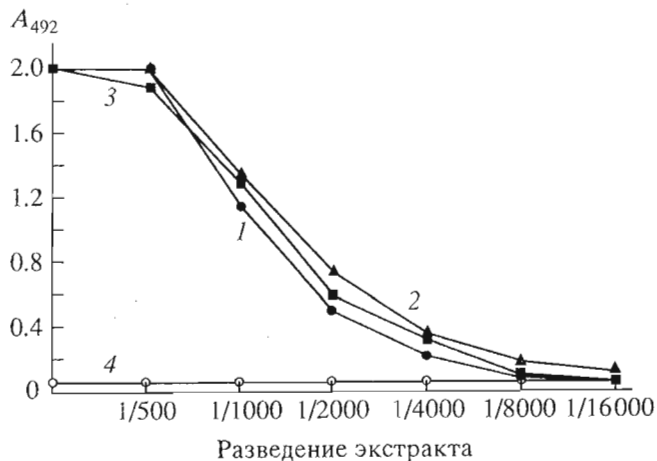


Рис. 2. Определение BNYVV в экстрактах листьев зараженных растений в системах с использованием биотинилированных МА R4-Bi и конъюгатов Str-ПХ20 (1), Str-ПХ40 (2) и Str-ПХ80 (3). Сенсibilizировали твердую фазу МА R3. 4 – уровень неспецифического связывания с экстрактом листьев растений, инфицированных вирусом табачной мозаики (для всех трех конъюгатов не превышал 0.07  $OE_{492}$ ).

смешанную инфекцию (в основном вирус табачной мозаики, который часто сопровождает BNYVV в пробах из корнеплодов сахарной свеклы). Антиген BNYVV получали по методу [13]. Листья зараженных растений гомогенизировали в 0.1 М трис-НСI-буфере, рН 9.0, в соотношении 1 : 2. В гомогенат добавляли Тритон-X100 (3%) и мочевины (до концентрации 1 М), перемешивали на магнитной мешалке в течение ночи, после чего центрифугировали 20 мин при 9000 об/мин. Супернатант центрифугировали 2 ч при 30000 об/мин на центрифуге Spinco L-2 (ротор Ti-60). Осадок ресуспендировали в 0.01 М трис-НСI-буфере, рН 9.0, с добавлением 0.5 М мочевины и полученную суспензию центрифугировали при низких скоростях. Супернатант центрифугировали 2 ч при 30000 об/мин, помещая его в центрифужную пробирку, заполненную на 2 см 15% раствором сахарозы (Spinco L-2, ротор SW-27). Осадок растворяли в 0.01 М трис-НСI-буфере и центрифугировали 18 ч в градиенте CsCl при 35000 об/мин (ротор SW-55). Опалесцирующую вирусную зону удаляли шприцем с тонкой иглой, после чего суспензию вируса разводили в 10 раз буфером и центрифугировали 1 ч при 40000 об/мин для удаления цезия. Осадок ресуспендировали и использовали в качестве антигена.

Иммунизацию мышей линии BALB/c проводили путем 2 - 3-кратного внутрибрюшинного введения 20 - 30 мкг очищенного антигена BNYVV в адъюванте Фрейнда с интервалом 2 - 3 нед. Первую иммунизацию проводили в полном адъюванте Фрейнда, последующие – в неполном. За три дня до гибридизации мышам внутрибрюшинно

вводили 40 - 50 мкг очищенного антигена в фосфатном буфере без адъюванта.

**Получение гибридом, продуцирующих моноклональные антитела к BNYVV.** Спленоциты иммунной мыши сливали с миеломными клетками линии Ра1 с использованием в качестве сливающего агента 45% раствора полиэтиленгликоля-1500 в соответствии с процедурой, предложенной в работе [14]. После отмывки продукты слияния, суспендированные в среде HAT-DMEM с 10% телячьей эмбриональной сыворотки, равномерно распределяли по пяти 96-луночным планшетам, в которые предварительно были внесены в качестве питающих клеток макрофаги перитонеальной жидкости неиммунной мыши. Планшеты инкубировали до появления гибридных колоний, после чего гибридомы тестировали на синтез специфических антител методом непрямого сэндвич-ИФА.

Первичные гибридомные культуры клонировали методом лимитирующих разведений не менее двух раз, отбирая на каждой стадии клоны с наибольшей пролиферативной активностью и устойчивым синтезом специфических антител.

Для наработки препаративных количеств МА гибридомы в количестве  $5 \times 10^6 - 1 \times 10^7$  клеток вводили мышам линии BALB/c, которым за 10 - 14 сут до этого было введено 0.5 мл пристана. Через 10 - 14 сут мышей с выраженным ростом асцитной опухоли забивали и собирали асцитную жидкость.

МА из асцита очищали методом двукратного осаждения насыщенным раствором сульфата аммония до 50% насыщения с последующей аффинной хроматографией на белок-А-сефарозе по методу [15].

Подкласс МА определяли в ИФА с использованием конъюгатов кроличьих антител против подклассов иммуноглобулинов мыши по прилагаемой фирмой-изготовителем инструкции.

**Приготовление растительных экстрактов.** Растительный материал (листья инфицированных BNYVV растений) предварительно взвешивали, добавляли PBS из расчета 5 мл буфера на 1 г исследуемого материала, измельчали в фарфоровой ступке и осадок отделяли центрифугированием при 5000g в течение 10 мин. Полученный экстракт хранили при  $-20^\circ\text{C}$  в 50% глицерине.

**Биотинилирование иммуноглобулинов.** Раствор МА диализовали против 0.1 М раствора бикарбоната натрия, pH 8.6, концентрацию антител доводили до 2.0 - 3.0 мг/мл тем же буфером, добавляли 0.1 объема N-оксисукцинимидного эфира аминоксаноилбиотина в концентрации 1.0 мг/мл в DMSO и инкубировали 2 ч при  $20^\circ\text{C}$ , затем диализовали против PBS.

Конъюгаты МА с пероксидазой из хрена получали по методу [16].

Конъюгат стрептавидина с пероксидазой из хрена получали по методу, описанному в работе [17].

**Непрямой сэндвич-ИФА.** Для выявления МА, специфически взаимодействующих с BNYVV, в лунки 96-луночных планшетов последовательно вносили:

1) 50 мкл кроличьей поликлональной антисыворотки к BNYVV в разведении 1/1000 в карбонат-бикарбонатном буфере, pH 9.6 (инкубировали 18 ч при  $4^\circ\text{C}$ );

2) 100 мкл 1% раствора BSA в PBS (инкубировали 1 ч);

3) 50 мкл экстракта листьев инфицированных BNYVV растений в разведении 1 : 50 в PBS, содержащем 0.05% Tween-20 (PBS-Tween) (инкубировали 1 ч);

4) 50 мкл тестируемой культуральной жидкости (инкубировали 1 ч);

5) 50 мкл кроличьих антимышиных антител, конъюгированных с пероксидазой из хрена в рабочем разведении в PBS-Tween (инкубировали 1 ч);

6) 50 мкл субстратного раствора, содержащего 1 мг/мл орто-фенилендиамина и 0.06% перекиси водорода в 0.1 М цитратном буфере, pH 5.0.

Все этапы, начиная со второго, проводили при  $20^\circ\text{C}$ . Между стадиями планшеты промывали 3 - 5 раз PBS-Tween. Развитие окраски останавливали добавлением 50 мкл 1 н.  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Оптическое поглощение продуктов ферментативной реакции измеряли на спектрофотометре Titertek Multiskan при длине волны 492 нм.

**Определение BNYVV методом прямого сэндвич-ИФА.** В лунки 96-луночных планшетов последовательно вносили:

1) 50 мкл сенсibiliзирующих антител (инкубировали в течение ночи при  $4^\circ\text{C}$ );

2) 100 мкл 1% раствора BSA в PBS (инкубировали 1 ч);

3) 50 мкл вируссодержащего материала, последовательно разведенного PBS-Tween (инкубировали 1 ч);

4) 50 мкл конъюгата МА-ПХ в рабочем разведении в PBS-Tween (инкубировали 1 ч). Внесение субстратного раствора и последующие стадии проводили аналогично непрямому сэндвич-ИФА.

**Определение BNYVV с использованием стрептавидин-биотиневой системы.** Первые три стадии проводили так же, как и при постановке прямого сэндвич-ИФА. Затем в лунки вносили по 50 мкл биотинилированных МА в PBS-Tween с добавлением 1% BSA, инкубировали 1 ч при  $20^\circ\text{C}$ , промывали 3 - 4 раза PBS-Tween, после чего вносили конъюгат стрептавидина с ПХ или с полимерной ПХ в рабочем разведении в PBS-Tween с 1% BSA

и инкубировали 1 ч при 20°C. Внесение субстратного раствора и последующие стадии проводили аналогично непрямому сэндвич-ИФА.

Результаты представляли в виде зависимости величины оптического поглощения образовавшегося продукта ферментативной реакции от разведения растительного экстракта (кривые титрования). За чувствительность метода принимали разведение растительного экстракта, при котором регистрируемая величина оптического поглощения продукта ферментативной реакции в 2 раза превышает поглощение в контрольной пробе. В качестве контроля при тестировании ВNYVV использовали экстракт из листьев здоровых или инфицированных вирусом табачной мозаики растений.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tamada T., Abe H. // J. Gen. Virol. 1989. V. 79. P. 3391 - 3398.
2. Torrance L., Pead M.T., Buxton G. // Ann. Appl. Biol. 1988. V. 113. P. 519 - 530.
3. Commandeur U., Koenig R., Lesemann D.-E., Torrance L., Burgermeister W., Liu Y., Schots A., Alric M., Grassi G. // J. Gen. Virol. 1992. V. 73. P. 695 - 700.
4. Boonekamp P.M., Pomp H., Gussenhoven G.C., Schots A. // Acta Bot. Neerl. 1990. V. 40. P. 41 - 52.
5. Lesemann D.-E., Koenig R., Torrance L., Buxton G., Boonekamp P.M., Peters D., Schots A. // J. Gen. Virol. 1990. V. 71. P. 731 - 733.
6. Commandeur U., Koenig R., Manteuffel R., Torrance L., Luddecke P., Frank R. // Virology. 1994. V. 198. P. 282 - 287.
7. Сухачева Е.А., Новиков В.К., Плаксин Д.Ю., Павлова И.С. // Биооргани. химия. 1995. Т. 21. С. 819 - 824.
8. Avrameas S. // J. Immunol. Methods. 1992. V. 150. P. 23 - 32.
9. Hill E.K., Hill J.H., Durand D.P. // J. Gen. Virol. 1984. V. 65. P. 525 - 532.
10. Sherwood J.L., Sanborn M.R., Keyser G.C. // Phytopathology. 1987. V. 77. P. 1158 - 1161.
11. Martin R.R., Stace-Smith R. // Can. J. Plant. Pathol. 1984. V. 6. P. 206 - 210.
12. Plaksin D.Yu., Gromakovska E.T. // J. NIH Res. 1994. V. 6. P. 47.
13. Koenig R., Lesemann D.-E., Burgermeister W. // Phytopath. Leit. 1984. V. 111. P. 240 - 255.
14. Van Deusen R.A. // Hybridoma Technology in Agricultural and Veterinary Research / Eds N.J. Stern, H.R. Gamble. Totowa: Rowman and Allanheld Publ., 1984. P. 15 - 25.
15. Ey P.L., Prowse S.J., Jenkin C.R. // Immunochemistry. 1978. V. 15. P. 429 - 436.
16. Nakane P.K. // Immunoassays: Clinical Laboratory Techniques for the 1980s / Eds R.M. Nakamura, W.R. Dito, E.S. Toker III. N.Y.: Alan R. Liss, Inc., 1980. P. 157 - 169.
17. Tijssen P., Kurstak E. // Anal. Biochem. 1984. V. 136. P. 451 - 457.

## An Enzyme Immunoassay for Detection of Beet Necrotic Yellow Vein Virus Using Monoclonal Antibodies

E. A. Sukhacheva\*,<sup>1</sup> L. P. Kozlov\*\*, D. Yu. Plaksin\*\*\*,  
I. S. Pavlova\*, and S. M. Ambrosova\*

\* 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 Plant Protection, St. Petersburg, Russia

\*\*\* Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Division,  
Russian Academy of Sciences, Perm', Russia

**Abstract**—Five stable hybridoma lines producing monoclonal antibodies to beet necrotic yellow vein virus were obtained. The subclass for all the monoclonal antibodies was determined. An enzyme immunoassay system was developed to detect the virus in leaf extracts from infected plants. The direct sandwich-EIA using monoclonal antibodies alone was compared to the assay system using biotinylated monoclonal antibodies and conjugates of streptavidin with monomeric or homopolymeric horseradish peroxidase. The diagnostic enzyme immunoassay system using monoclonal antibodies and the conjugate of streptavidin with polymeric horseradish peroxidase is shown to possess the maximum sensitivity. It can detect virus in leaf extracts from infected plants at a dilution of up to 1/12000.

*Key words:* beet necrotic yellow vein virus, monoclonal antibodies, enzyme immunoassay system.

<sup>1</sup> To whom correspondence should be addressed.