

## **ЗБЕРІГАННЯ ПРЕПАРАТІВ АНТИГЕНУ ДЛЯ ВИРОБНИЦТВА ДІАГНОСТИЧНИХ СИРОВАТОК ДО ФІТОПАТОГЕННИХ ВІРУСІВ**

**Мамчур О.Є., Дмитрук О.О., Коломієць Л.П.,  
Зарицький М.М.**

Інститут сільськогосподарської мікробіології УААН,  
вул. Шевченка, 97, м. Чернігів, 14027, Україна  
E-mail: omam8@mail.ru

*Пропонується метод зберігання очищених препаратів вірусу аukuба мозаїки картоплі і Y-вірусу картоплі, іммобілізованих в поліакриламідний гель. Метод може використовуватися для зберігання вірусних антигенів протягом 6-ти місяців при кімнатній температурі для отримання специфічних антисироваток.*

*Ключові слова: вірус аukuба мозаїки картоплі, Y-вірус картоплі, чисті препарати вірусу, іммобілізація в ПААГ.*

Сьогодні при проведенні первинного фітосанітарного контролю агроценозів майже в усіх країнах найбільше використовуються методи серології у поєднанні з електронно-мікроскопічними. Дослідження зразків рослинних тканин за допомогою серологічних методів (крапельна аглютинація і преципітація, імуоферментний аналіз, імуоелектронна мікроскопія) дозволяють отримати інформацію про наявність вірусних антигенів та їх таксономічну належність. Перевагами серологічних методів є висока чутливість і специфічність детекції та ідентифікації вірусних антигенів [1]. Створення методів і засобів імунодіагностики вимагає отримання вірусоспецифічних діагностичних антисироваток на основі сконцентрованих вірусних антигенів, які характеризуються високим ступенем чистоти [2, 3].

Імуногенні властивості вірусів найкраще виявляються, якщо для імунізації тварин використовують свіжовиготовлені вірусні препарати, отримані з молодих інфікованих рослин за максимальної концентрації вірусу. Але період інтенсивного росту рослин-індикаторів і строки накопичення вірусів в умовах вегетаційної кімнати не завжди співпадають з оптимальними строками імунізації кролів (влітку кролі линяють, що призводить до неспецифічних реакцій при проведенні імунологічних аналізів)

[3]. Тому, виготовлені очищені препарати вірусів потребують таких способів зберігання, які забезпечують підтримання антигенних та імуногенних властивостей вірусів протягом певного часу.

Існують традиційні способи зберігання вірусних препаратів за температури нижче  $-20^{\circ}\text{C}$ , у рідкому азоті при  $-196^{\circ}\text{C}$  [4] або у ліофілізованому стані [5], які забезпечують збереженість віріонів протягом року і більше. Але деякі віруси при заморожуванні піддаються деструкції і тому не можуть зберігатися цими способами. Консервування очищених вірусних препаратів сахарозою або гліцерином дозволяє зберігати їх імуногенні властивості протягом кількох тижнів за температури  $8-10^{\circ}\text{C}$ . Застосування 33 %-ного сульфату амонію є ефективним при тривалому збереженні ряду очищених вірусних препаратів (ХВК, УВК, МВК, ВАМК), але перед використанням препарати необхідно звільнити від солі, що супроводжується зниженням концентрації антигену.

Застосування іммобілізованих ферментів, цілих клітин та їх органодів, антитіл, антигенів широко використовується у сучасній біотехнології. Метод іммобілізації в масу полімерного носія (альгінат, желатин, колаген, целюлоза, поліакриламід та ін.) полягає у внесенні суспензії клітин мікроорганізмів у розчин мономерів, створенні умов для полімеризації суспензії, коли відбувається механічне включення клітин мікроорганізмів у структуру носія. Для мікроорганізмів частіше як носій використовується поліакриламідний гель (ПААГ), який має пористу структуру, механічну міцність, однорідний за складом, хімічно інертний, нетоксичний, а також забезпечує стабільність іммобілізованих препаратів [6]. Крім того, ПААГ має властивості ад'юванту, що сприяє посиленню імуностимуляції при імунізації тварин [3].

Метою нашої роботи було дослідження можливості використання методу іммобілізації в ПААГ для зберігання очищених препаратів вірусів картоплі при виробництві діагностичної антисироватки.

**Матеріали і методи.** У роботі використовували вірус аукуба мозаїки картоплі (*Potato aucuba mosaic virus*, штам ВАМК-об) та Y-вірус картоплі (*Potato virus Y*, штам УВК-к), які зберігаються в колекції фітопатогенних вірусів Інституту сільськогосподарської мікробіології.

Накопичення Y-вірусу картоплі проводили на рослинах тютюну справжнього (*Nicotiana tabacum* L.), ВАМК – на рослинах махорки

(*Nicotiana rustica* L.), які вирощували в посудинах, заповнених сумішшю торфу, ґрунту, піску та перегною (співвідношення 3:2:1:1) у вегетаційній кімнаті за 20-22 °С і фотоперіоді 16 год. Інфекційний матеріал відбирали у період максимального накопичення вірусу: листки рослин махорки, уражених ВАМК – на 18-21 день; листки тютюну, інфікованого Y-вірусом картоплі – на 21-25 день після інокуляції.

При очищенні та концентруванні препаратів YBK і ВАМК використовували відомі методики [7, 8].

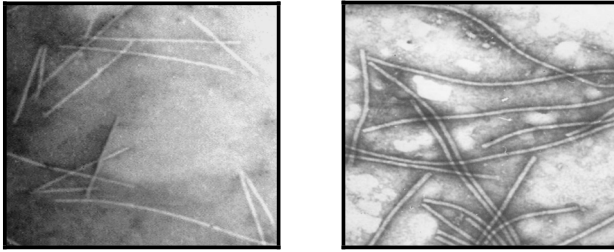
ПААГ отримували шляхом полімеризації акриламід у N,N-метилен-біс-акриламід, ініціатор реакції – персульфат амонію, промотор ініціатора – N,N,N,N-тетраметілетилендіамін (ТЕМЕД). Використовували 30 %-й розчин мономерів з концентрацією метилен-біс-акриламід у 2,7 % та 2,5 % розчин персульфату амонію [9].

Контроль етапів отримання чистих препаратів вірусів і препаратів, іммобілізованих у ПААГ, проводили методом електронної мікроскопії нативних препаратів, контрастованих 2 %-ним розчином фосфорно-вольфрамової кислоти. Досліджували препарати в електронних мікроскопах Tesla-540 та EM-125 при інструментальному збільшенні 20 тис.

**Результати та їх обговорення.** За тривалого зберігання очищених вірусних препаратів однією з основних причин втрати антигенних властивостей вірусів є денатурація капсидних білків [2]. При іммобілізації в ПААГ завдяки наявності гідрофобного полімерного ланцюга макромолекули і гідрофільних карбонільних груп у структурі полімерів можливе фізичне зв'язування вірусних часток з полімерною матрицею, що дає змогу зберігати вірусні частки протягом певного часу. Даний метод базується на взаємодії розчину мономерів з очищеною суспензією вірусних часток.

Для дослідження отримували препарати вірусів з високим ступенем чистоти (для Y-вірусу картоплі співвідношення  $D_{260/280}$  складало 1,2; для ВАМК – 1,1) та концентрацією вірусу (для YBK – 2 мг/мл, для ВАМК – 4 мг/мл).

Дані електронної мікроскопії підтвердили присутність в очищених препаратах ВАМК ниткоподібних часток вірусу, модальна довжина яких становила  $590 \pm 2$  нм. В очищених препаратах Y-вірусу картоплі виявлено характерні за морфологічними ознаками частки з модальною довжиною  $740 \pm 5$  нм (рис. 1).



*Рис. 1. Очищені вірусні препарати ВАМК (ліворуч) і Y-вірусу картоплі (праворуч), інструментальне збільшення  $\times 20\ 000$*

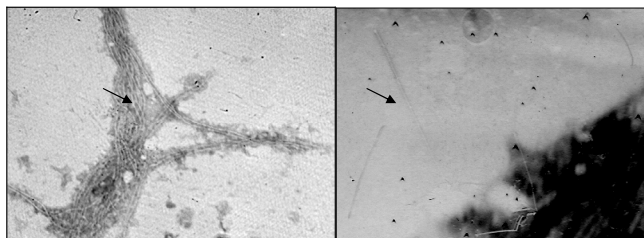
Для іммобілізації вірусних часток використовували 10 % ПААГ, який має оптимальні механічні та адсорбційні властивості [9]. У 30 %-й водний розчин мономерів об'ємом 4 мл додавали при інтенсивному перемішуванні за допомогою магнітної мішалки 8 мл очищеного вірусного антигену (концентрація 2 мг/мл), 0,3 мл 2,5 % персульфату амонію та 3 краплі ТЕМЕД. Реакційну суміш розливали у скляні флакони по 2 мл і витримували протягом 15-20 хв. для завершення процесу іммобілізації. Після полімеризації гелю флакони закупорювали і зберігали протягом 6-ти місяців за кімнатної температури.

Дослідження збереженості іммобілізованих в ПААГ вірусних препаратів проводили за допомогою електронної мікроскопії та методу біотестування. Монолітний гель з іммобілізованим антигеном після 6-ти місяців зберігання ретельно розтирали у фарфоровій ступці, суспендували 0,1 М фосфатним буфером, рН 7,4 і центрифугували при 1000 g протягом 15 хв. Отримані супернатанти використовували для визначення збереженості морфологічних ознак вірусу та інфекційних властивостей препаратів.

З рис. 2 видно ефективну адсорбцію вірусних часток ВАМК всередині полімерної матриці 10 %-ного ПААГ. Віріони щільно упаковані у товщі гелю, що дозволяє зберігати морфологію вірусних часток, іммобілізованих в ПААГ, протягом 6-ти місяців. Виявлено також вірусні частки, характерні для досліджуваних вірусів за морфологією та розмірами.

Інфекційність іммобілізованих препаратів перевіряли методом біотестування: для Y-вірусу картоплі використовували рослини тютюну справжнього і махорки; для ВАМК – рослини перцю і тютюну. На всіх уражених рослинах ознак інфікування

не спостерігали, що підтвердили дані серології та електронної мікроскопії. Тобто, вірусні препарати втрачають свою інфекційність після іммобілізації в ПААГ.



*Рис. 2. Вірусні частки, іммобілізовані в ПААГ (ВАМК та УВК), після 6-ти місяців зберігання, інструментальне збільшення  $\times 20\ 000$*

Вивчення імуногенної активності, на прикладі ВАМК, показало, що іммобілізовані в ПААГ вірусні препарати здатні викликати в організмі імунованих тварин утворення антитіл. Для приготування антигену гель розтирали, додавали фізіологічний розчин (1:1, об'єм/об'єм) і центрифугували за 1000 g протягом 15 хв. Отриманий надосад використовували як антиген, де ПААГ виконував функцію ад'юванту. Специфічну антисироватку отримували за схемою, яка передбачала три ін'єкції по 0,5 мл антигену з чергуванням підшкірних та внутрішньошкірних уведень. Через тиждень після останньої імунізації тричі відбирали кров з крайової вухної вени та визначали титр антисироватки. Діагностична сироватка давала реакцію крапельної аглютинації з інфікованим ВАМК рослинним матеріалом при максимальному розведенні 1:2048. Отримана антисироватка специфічна і не вступає в реакцію з екстрактами зі здорових рослин-накопичувачів (*Nicotiana rustica* L.), картоплі і тест-рослин, інфікованих X, S, M, Y-вірусами картоплі.

Таким чином, іммобілізація очищених вірусних препаратів ВАМК і Y-вірусу картоплі в ПААГ дозволяє зберігати їх протягом 6 місяців при кімнатній температурі і використовувати як антиген для імунізації кролів. Інфекційні властивості іммобілізованих в ПААГ очищених препаратів ВАМК і Y-вірусу картоплі не зберігаються.

1. Мельничук М.Д. Фітовірусологія: навчальний посібник /М.Д. Мельничук. – К.: Поліграф Консалтинг, 2005. – 200 с.
2. Мэтьюз Р. Вирусы растений: пер. с англ. /Р. Мэтьюз. – М.: Мир, 1973. – 592 с.
3. Гнутова Р.В. Иммунологические исследования в фитовирусологии /Р.В.Гнутова. – М.: Наука, 1985. – С. 147-153.
4. Wijs J.J. De. The long-term preservation of *potato virus Y* and *watermelon mosaic virus* in liquid nitrogen in comparison to other preservation methods /De Wijs J.J., Suda-Bachmann F. //Nethrl. J. Plant Pathol. – 1979. – Vol. 85, N 1. – P. 23-29.
5. Purcifull D.E. Preservation of plant virus antigens by freeze-drying /Purcifull D.E., Christie S.R., Batchelor D.L. //Phytopathol. – 1975. – Vol. 65, N 11. – P. 1202-1205.
6. Волова Т.Г. Введение в биотехнологию. Версия 1.0 [Электронный ресурс]: электрон. учеб. пособие /Т.Г. Волова. – Красноярск: ИПК СФУ, 2008.
7. Новиков В.К. Метод получения препарата Y-вируса картофеля и приготовление диагностических антисывороток /В.К. Новиков, И.Г. Атабеков, М.О. Агур [и др.] //С.-х. биол. – 1982. – Т. 17, № 5. – С. 706-711.
8. Мамчур О.Є. Метод отримання очищених препаратів вірусів рослин /Мамчур О.Є., Дмитрук О.О., Коломієць Л.П., Зарицкий М.М. //С.-г. мікробіол.: міжвід. темат. наук. зб. – Чернігів, ЦНТЕІ, 2005. – С. 165-170.
9. Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. Электрофорез и ультрацентрифугирование /Л.А. Остерман. – М.: Наука, 1981. – 274 с.

**ХРАНЕНИЕ ПРЕПАРАТОВ АНТИГЕНА  
ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА АНТИСЫВОРОТОК  
К ФИТОПАТОГЕННЫМ ВИРУСАМ**

**Мамчур О.Е., Дмитрук О.А., Коломиец Л.П.,  
Зарицкий М.М.**

Институт сельскохозяйственной микробиологии УААН,  
г. Чернигов

*Предлагается метод хранения очищенных препаратов вируса аукуба мозаики картофеля и Y-вируса картофеля, иммобилизованных в полиакриламидном геле. Метод может использоваться для хранения вирусных антигенов в течение 6-ти месяцев при комнатной температуре для получения специфических антисывороток.*

*Ключевые слова: вирус аукуба мозаики картофеля, Y-вирус картофеля, чистые препараты вируса, иммобилизация в ПААГ.*

**PRESERVATION OF ANTIGEN PREPARATIONS  
FOR PRODUCTION OF ANTISERUMS TO  
PHYTOPATHOGENIC VIRUSES**

**Mamchur A.E., Dmitruk O.A., Kolomiets L.P.,  
Zaritzky M.M.**

Institut of Agricultural Microbiology UAAS, Chernihiv

*The method of preservation of potato aucuba mosaic virus and potato virus Y purified preparations immobilized in polyacrylamide gels is provided. The method may be used for preservation of viral antigens for 6 months at room temperature for obtaining a specific antiserums.*

*Key words: potato aucuba mosaic virus, potato virus Y, purified virus preparations, immobilization in PAAG.*