

ИММУНОФЕРМЕНТНАЯ ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ВИРУСА ЖЕЛТОЙ КАРЛИКОВОСТИ ЯЧМЕНЯ

**К.А. Можаяева, Т. В. Кастальева, Т.Я. Васильева —
Всероссийский НИИ фитопатологии, Т.Н. Ерохина, Институт
биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А.
Овчинникова РАН**

Вирус желтой карликовости ячменя (ВЖКЯ) является одним из наиболее распространенных и опасных патогенов, поражающих все зерновые культуры и злаковые травы. Этот вирус отмечен в странах и регионах, где сосредоточено 95% мирового производства зерна. Эпифитотии ВЖКЯ периодически происходят в большинстве этих регионов (Северная Америка, Европа, Малая Азия, Австралия).

За рубежом ежегодные потери урожая неустойчивых сортов достигают 10—15%, а в годы эпифитотии — 60— 90%. По расчетам специалистов, только в США при 1%-ном уровне поражения посевов зерновых и кукурузы ежегодные потери от ВЖКЯ достигают 250 млн дол. Из-за повсеместного распространения и вызываемых потерь это заболевание названо «желтой чумой» злаковых культур.

В нашей стране заболевание зерновых культур, вызываемое ВЖКЯ, известно с 1961 г. Эпифитотийные поражения посевов ячменя и овса 1988— 1991 гг. в основном были вызваны этим вирусом. По данным ЦИНАО, в большинстве областей Нечерноземной и Центрально-Черноземной зон было поражено около 2 млн га посевов, причем в некоторых районах Нечерноземья на больших площадях посевы списывались, так как снижение урожая достигало 90%. Эпифитотия показала как необходимость борьбы с заболеванием, так и неготовность к ее проведению, поскольку в стране не было устойчивых сортов и надежных методов идентификации патогена. Начиная с 1991 г. эпифитотия пошла на убыль, однако проблема идентификации болезни и борьбы с ней продолжает оставаться, так как эпифитотии ВЖКЯ имеют тенденцию периодически повторяться.

Для идентификации ВЖКЯ используются биологические (визуальная диагностика, тлипереносчики) и инструментальные (электронная микроскопия, серология, специфическое обнаружение РНК) методы. Из числа последних наиболее доступным, достаточно специфичным и надежным является иммуноферментный анализ (ИФА = ELISA). ВНИИФ совместно с ИБХ являются пионерами в создании отечественной иммуноферментной тест-системы на основе моноклональных антител для определения наиболее распространенных на территории России штаммов ВЖКЯ. Предлагаемая тестсистема более экономична, чем система на основе поликлональных антител, так как не требует постоянной дорогостоящей наработки больших количеств антигена, иммунизации кроликов и получения антисыворотки. Используемая нами технология дает возможность получения моноклональных антител в условиях научного учреждения.

Наработка антигена ВЖКЯ в количествах, необходимых для изготовления специфической поликлональной антисыворотки или для получения моноклонов, сопряжена с трудностями, обусловленными биологическими свойствами этого вируса.

Размножение ВЖКЯ в растении, как и других лютеовирусов, ограничено флоэмой. Вирус накапливается в небольших концентрациях и трудно извлекается из тканей злаков. Кроме того, он передается только тлями, а это затрудняет искусственное заражение растений при выращивании их с целью накопления вируса, т.к. разведение и поддержание вирофорных тлей технологически сложная

задача.

В зависимости от вида переносчика различают 5 штаммов ВЖКЯ: PAV, MAV, SGV, RPV, RMV, которые образуют 2 неродственные серологические подгруппы (PAV, MAV, SGV— первая, RPV, RMV— вторая).

Для выделения вируса мы использовали естественно зараженные растения овса и ячменя и методику, предусматривающую применение целлюлитических ферментов с целью наиболее полного извлечения вируса из растительных тканей. Выбор оптимальных условий экстрагирования и концентрирования вирусного препарата позволил получать в зависимости от содержания патогена в образце и степени очистки от 0,2 мг до 2,5 мг антигена из 1 кг сырой ткани. Очищенные вирусные препараты обладали максимальным поглощением при 260 нм, а минимальным — при 243 нм. Соотношение A_{260}/A_{280} составляло 1,50—1,60, что характерно для сферических вирусов.

Коэффициент экстинкции ВЖКЯ ($E_{260}^{01\%}$) считали равным 7,8.

Получение вирусных препаратов высокой степени очистки было первым необходимым этапом в работе по созданию диагностикумов для определения ВЖКЯ. Следующим этапом было получение моноклональных антител к ВЖКЯ с помощью гибридной технологии. Высокоочищенные препараты ВЖКЯ использовали для иммунизации, мышей и отбора моноклонов, продуцирующих антитела к ВЖКЯ.

Мышей линии BALB/симунизировали препаратом ВЖКЯ, выделенным из естественно инфицированного материала. Интервал между первой и второй иммунизациями составил 2 нед. Между второй и третьей — 4 нед. На четвертые сутки после последней иммунизации клетки селезенки иммунной мыши гибридизовали с клетками миеломы. Было проведено 2 гибридизации: одна с использованием миеломных клеток Ра1, другая — с использованием миеломных клеток Р3Х63.Аg8.653. После появления гибридных клонов культуральную жидкость тестировали на присутствие специфических к ВЖКЯ антител методом непрямого ИФА, при котором антиген сорбировали непосредственно на планшеты. Гибридные клетки, давшие положительную реакцию с антигеном, клонировали методом лимитирующего разведения для отбора собственно моноклонов, то есть клонов, происходящих из одной клетки и характеризующихся стабильной продукцией специфических к антигену моноклональных антител. Эту операцию повторяли дважды с интервалом 3—4 нед.

В результате было отобрано 5 положительных клонов, продуцирующих моноклональные антитела к ВЖКЯ: 4D5, 3С3 (получены от миеломной линии Р3Х63.Аg8.653) и 1D2, 3С2, 1С5 (получены от миеломной линии Раg). Изучение штаммовой специфичности и чувствительности всех пяти моноклонов привело к тому, что окончательно для создания диагностикумов были выбраны 2 моноклона (4В5 и 3С2), подвергнутые затем реклонированию. Отбор моноклонов с избирательной специфичностью при реклонировании проводили с помощью «сэндвич»-варианта ИФА, в котором использовали поликлональные штаммспецифические антисыворотки из Американской коллекции типовых культур (АТСС).

Антитела, вырабатываемые моноклоном 4В5, обладали универсальной специфичностью в отношении штаммов ВЖКЯ первой серологической подгруппы (штаммы PAV, MAV, SGV). Антитела моноклона 3С2 были специфичны по отношению к штамму RPV второй серологической подгруппы при определении ВЖКЯ в растительных экстрактах; при определении ВЖКЯ в очищенных вирусных препаратах они также могли взаимодействовать и с PAV штаммом.

Таким образом, разработана иммуноферментная тест-система на основе моноклональных антител и создано 2 диагностикума, один из которых предназначен для определения наличия в растительном образце штаммов PAV, MAV и SGV, а второй — для определения штамма RPV ВЖКЯ. Диагностикумы предназначены для определения ВЖКЯ в тканях растений (листьях, корнях) с помощью «сэндвич»-варианта ИФА. Они включают специфические моноклональные антитела, предназначенные для сорбции антигена, и конъюгаты этих антител с пероксидазой хрена для выявления специфически сорбированных антигенов. По чувствительности оба диагностикума соответствуют диагностикумам фирмы Agdia(США) на основе поликлональных антител.

Собранные для анализа образцы растений должны быть высушены на воздухе при комнатной температуре. После этого они могут храниться в течение нескольких месяцев также при комнатной температуре. Перед анализом их растирают до порошкообразного состояния с жидким азотом и экстрагируют буфером для образцов в течение 12—18 ч при периодическом помешивании. Перед нанесением для проведения ИФА используется одна из стандартных методик, адаптированная специально для ВЖКЯ. Подробно методика описана в инструкции, которой снабжены диагностикумы.

Стоимость одного диагностического набора для определения ВЖКЯ (1000 анализов), включающего моноклональные антитела и их конъюгаты с пероксидазой хрена, составляет примерно 100—150 дол. Наборы могут храниться в течение 1 года при -20°C .

Разработанные ВНИИФ совместно с ИБХ диагностические тест-системы могут быть использованы в научных целях, а также в селекционных программах по созданию сортов зерновых культур, устойчивых к ВЖКЯ, и для оценки фитосанитарного состояния посевов с целью прогнозирования возникновения эпифитотий и ограничения вредоносности патогена. XXI