

«Сейфуллин окулары–12: Ғылым жолындағы жастар - болашақтың инновациялық әлеуеті» атты Республикалық ғылыми-теориялық конференциясының материалдары = Материалы Республиканской научно-теоретической конференции «Сейфуллинские чтения–12: Молодежь в науке-инновационный потенциал будущего». – 2016. – Т.І, ч.1. – С. 175-178

ПОЛУЧЕНИЕ ПОЛИКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ, СПЕЦИФИЧНЫХ К Y-ВИРУСУ КАРТОФЕЛЯ С ЦЕЛЬЮ СОЗДАНИЯ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ТЕСТОВ

Бейсембина Б., Кенжегалиева Д.К.

В настоящее время средняя урожайность картофеля в картофелеводческих развитых зарубежных странах достигает 45-50 т/га в отличие от урожайности данной культуры в Республике Казахстан не превышающей 16 т/га [1]. Основной причиной низкой продуктивности картофеля является поражение вирусными болезнями [2].

Наиболее вредоносными и распространенным на территории стран СНГ, Республики Казахстан, а также ряде зарубежных стран является Y-вирус картофеля, который вызывает снижение урожая до 80 % [3, 4].

Для повышения урожайности картофеля требуется организация элитного семеноводства картофеля, которое основано на биотехнологических методах оздоровления, диагностики и ускоренного размножения.

Одним из важных этапов получения оздоровленного материала картофеля является выявление и выбраковка пораженных образцов с помощью высокочувствительных диагностических методов.

На сегодняшний день среди известных методов диагностики (ПЦР, ИХА, КА, РИДА, ДИДА, КП) вирусных заболеваний картофеля в большинстве картофелеводчески развитых стран остается востребованным метод иммуноферментного анализа, который применяется в практике безвирусного семеноводства картофеля для массового тестирования [5, 6].

Одним из основных этапов создания иммунодиагностических тест-систем для определения вирусов картофеля является получение антител, специфичных к определенному вирусному антигену.

Целью настоящей научно-исследовательской работы является получение поликлональных антител, специфичных к Y-вирусу картофеля.

Объектом исследований послужил очищенный препарат PVY^{Cherie-2}, полученный ранее из инфицированных PVY растений - регенерантов *N. tabacum* сорта Samsun в концентрации 1,9 мг/мл методом ультрацентрифугирования в отделе биотехнологии и иммунодиагностики ФГБНУ Всероссийский НИИ картофельного хозяйства им. А.Г. Лорха РАСХН (Московская область, Красково-1) [7, 8].

Проверку активности поликлональных антител осуществляли методом непрямого варианта ИФА[9]. Тестирование растений-накопителей вирусов картофеля проводили с помощью «сэндвич-варианта» ИФА [10].

Иммунизацию лабораторных мышей вирусным препаратом проводили в соответствии с общепринятой методикой [11] по трем схемам:

1) Короткая схема иммунизации: 0 день – 5 мкг/мл антигена + ПАФ в объеме 100 мкл; 7 сутки – 5 мкг/мл антигена + НАФ в объеме 100 мкл; 11 сутки – 5 мкг/мл антигена + PBS в объеме 100 мкл; 12 сутки – 5 мкг/мл антигена + PBS в объеме 100 мкл; 13 сутки – 5 мкг/мл антигена + PBS в объеме 100 мкл.

2) Длительная схема иммунизации: 0 день – 5 мкг/мл антигена + ПАФ в объеме 100 мкл; 14 сутки – 5 мкг/мл антигена + НАФ в объеме 100 мкл; 28 день – 5 мкг/мл антигена + PBS в объеме 100 мкл; 42 сутки – 5 мкг/мл антигена + PBS в объеме 100 мкл.

3) Длительная схема иммунизации: 0 день – 10 мкг/мл антигена + ПАФ в объеме 100 мкл; 7 день – 10 мкг/мл антигена + НАФ в объеме 100 мкл; 14 сутки – 10 мкг/мл антигена + PBS в объеме 100 мкл; 21 день – 10 мкг/мл антигена + PBS в объеме 100 мкл; 25 день – бустерная инъекция: 5 мкг/мл антигена в объеме 50 мкл.

С целью получения специфических антисывороток проводили иммунизацию лабораторных мышей очищенным препаратом PVY^{Cherie-2} по трем схемам.

Отобранные образцы мышинных антисывороток тестировались методом непрямого варианта ИФА в сравнении с полученными в предыдущих исследованиях неочищенной овечьей и очищенной, методом афинной хроматографии, кроличьей антисыворотками к Y-вирусу картофеля [12] (таблица 1).

Таблица 1 - Титры поликлональных сывороток, специфичных к PVY в непрямом ИФА

Вид антисыворотки	Титры антител при A ₄₉₂ , о.е.				
	1 схема	2 схема	3 схема	4 схема	5 схема
Мышинная	1:6400	-	-	-	-
Мышинная	-	1:3200	-	-	-
Мышинная	-	-	-	1:12800	-
Овечья	-	-	1:6400	-	-
Кроличья (контроль)	-	-	-	-	1:25600

Результаты ИФА показали, что, мышинная сыворотка полученная по длительной схеме иммунизации №3 уступала овечьей и кроличьей, однако показала наиболее высокий иммунный ответ с рабочим титром в 2-4 раза превышающим другие варианты иммунизации.

В дальнейших исследованиях полученные мышинные и овечьи неочищенные антисыворотки с максимальными титрами использовали в качестве первичных антител в «сэндвич-варианте» ИФА в сравнении с очищенными кроличьими поликлональными антителами специфичными к PVY в составе коммерческой иммуноферментной тест-системы при тестировании образцов растений табака зараженных различными штаммами

PVY из коллекции ФГБНУ ВНИИКХ им. А.Г. Лорха, а также образцов картофеля, инфицированных гетерологичными вирусами (PVX, PLRV, PVS, PVM) (таблица 2).

Таблица 2 – Тестирование образцов с использованием поликлональных антител в «сэндвич-варианте» ИФА

Вид поликлональной антисыворотки/схема иммунизации	Экстинция при A ₄₉₂ , о.е.							
	<i>Nicotiana t.</i> PVY ^O (Positive)	<i>Nicotiana t.</i> PVY ^N	<i>Nicotiana t.</i> PVY ^{Cherie}	<i>S. tuberosum</i> PVM	<i>S. tuberosum</i> PVS	<i>S. tuberosum</i> PVX	<i>S. tuberosum</i> PLRV	Negative
Мышиная/ 3	0.083	0.130	0.158	0.061	0.067	0.113	0.054	0.021
Овечья / 4	0.126	0.191	0.188	0.070	0.099	0.138	0.065	0.036
Кроличья / 5 (контроль)	0.267	0.340	0.306	0.047	0.077	0.062	0.060	0.029

Согласно данным таблицы 2, исследуемые виды мышинной и овечьей сывороток, в 2-3 раза уступали контрольному варианту по чувствительности к PVY^O и обладали сродством к гетерологичному вирусу PVX. В то же время, каждая из сывороток активнее реагировала с антигенами некротического штамма Y-вируса картофеля по сравнению с обычным штаммом.

Таким образом, в результате проведенных исследований подобрана оптимальная схема иммунизации лабораторных мышей, получены поликлональные антисыворотки к Y-вирусу картофеля.

Изучение полученных поликлональных антисывороток к вирусному препарату PVY^{Cherie-2} позволило подтвердить принадлежность вируса к некротическому штамму [13]. Изученные овечьи и мышинные поликлональные антисыворотки, после очистки можно использовать в качестве первичных антител и получения специфических к PVY конъюгатов как основных реагентов иммуноферментных тестов.

Список литературы

1. Токбергенова Ж.А. Қазақстанның картоп тұқым шаруашылығындағы жаһандық технологиялар / Инновационные технологии в семеноводстве картофеля Казахстана – Алматы: ЖШС «Таугуль – Принт» баспасы, 2015. 204 б.

2. Kogovsek, Polona; Pompe-Novak, Marusa; Petek, Marko et al. Primary Metabolism, Phenylpropanoids and Antioxidant Pathways Are Regulated in Potato as a Response to Potato virus Y Infection // PLOS ONE. – 2016. – V.11. - e0146135.

3. Блоцкая Ж.В. Вирусные болезни картофеля. – Мн.: Наука и техника, 1993. – 222 с.
4. Boonham N., Tomlinson J., Mumford R. Microarrays for rapid identification of plant viruses// *Annu. Rev. Phytopathol.* – 2007. – V. 45. – P. 307-328.
5. Швидченко В.К., Созинова Л.Ф. Оздоровление, размножение и диагностика в картофелеводстве. – Астана: КазАТУ им. С. Сейфуллина, 2000. – 163 с.
6. Гнутова Р.В. Серология и иммунохимия вирусов растений. - М.: Наука, 1993.- 301 с.
7. Хасанов В.Т., Бейсембина Б., Фида М.А. накопление Y-вируса картофеля в культуре каллуса *Nicotianatabacum* для получения вирусного препарата. Студент и наука: взгляд в будущее. 2014.- с. 375-381.
8. Отчет о НИР (инв.) № 0215РК02152, № ГР 0115РК00478. Создание банка отечественных штаммов вирусов картофеля для производства высокочувствительных диагностических тестов // Астана, 2015, 54 с
9. Атабеков И.Г., Бобкова А.Ф., Нацвишвили Н.М. и др. Методические рекомендации по применению иммуноферментного анализа для диагностики вирусов картофеля. – Москва, 1985. – 20 с.
10. Симаков Е.А., Усков А.И., Варицев Ю.А. Новые технологии производства исходного оздоровленного материала в элитном семеноводстве картофеля: рекомендации. – М., 2000. – 76 с.
11. Фримель Г. Иммунологические методы. - М.: Медицина, 1987. – С. 89-97.
12. Фида М.А., Решетняк В.В., Жексембаева Д.Л., Бейсембина Б. Получение антисывороток к Y-вирусу картофеля у различных видов животных // Материалы Республиканской научно-теоретической конференции «Сейфуллинские чтения–9: новый вектор развития высшего образования и науки» посвященная дню Первого Президента Республики Казахстан. – 2013. – Т.II, ч. 2. – С.18-20.
13. Хасанов В.Т., Варицев А.Ю., Бейсембина Б. Культура листовых каллусов- альтернативный метод создания и поддержания коллекции штаммов фитопатогенных вирусов на примере Y-вируса картофеля / Сборник научных трудов Всероссийского НИИ картофелеводства им. А.Г. Лорха. История развития и результаты научных исследований по культуре картофеля, Москва, 2015. – С. 437- 443.

Научный руководитель - к.б.н., доцент Хасанов В.Т