

ДИАГНОСТИКА ВИРУСА ЯМЧАТОСТИ ДРЕВЕСИНЫ ЯБЛОНИ МЕТОДОМ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

Проданюк Л.Н., д-р биол. наук

*Научно-практический институт садоводства, виноградарства и пищевых технологий
(Кишинев, Молдова)*

Реферат. В статье приведены результаты собственных исследований по оптимизации иммуноферментного анализа (ELISA) с использованием новой антисыворотки и диагностических наборов. Полученные результаты позволяют рекомендовать использование иммуноферментного анализа (ELISA) в системе сертификации посадочного материала плодовых семечковых культур.

Ключевые слова: яблоня, вирус, дерево, диагностика, иммуноферментный анализ (ELISA)

Summary. The article presents the results of our own study on optimization of enzyme immunoassay (ELISA) using the newly prepared antiserum and the diagnostic sets. The results obtained make it possible to recommend the use of the enzyme-linked immunoassay (ELISA) in the certification system for fruit seed planting material.

Key words: apple-tree, virus, wood, diagnostics, enzyme-linked immunoassay (ELISA)

Введение. Вирус ямчатости древесины яблони (ВЯДЯ) *Apple stem pitting virus (ASPV)* является вторым по распространенности на семечковых культурах вирусом после вируса хлоротической пятнистости листьев яблони [1-3]. Еще недавно идентификацию ВЯДЯ в исследуемых образцах проводили на растениях древесных индикаторов, требующих значительных затрат времени и средств. После удачного переноса в Голландии данного патогена на травянистые индикаторы в 1985 году японские исследователи, используя выделенные в Голландии изоляты, приготовили диагностическую антисыворотку, которая позволила идентификацию данного патогена проводить иммунологическими методами.

Вслед за японскими исследователями в лаборатории вирусологии Института плодородства в Кишиневе была получена антисыворотка к изоляту ВЯДЯ, выделенному в коллекционном саду института. Однако диагностические наборы, приготовленные на основе полученной в лаборатории антисыворотки, давали положительные результаты в тестах ИФА только при использовании в качестве источника инфекции ткани лепестков пораженных деревьев.

Объекты и методы исследований. Принцип иммуноферментного анализа (ИФА) основан на последовательном взаимодействии исследуемого вируса с сорбированными на твердой фазе антителами, далее взаимодействие с антителами, мечеными ферментом, с последующим выявлением фермента маркера в реакции [4].

После разработки микроварианта, с использованием полистирольных микроплат с 96 лунками в качестве твердой фазы, метод ИФА был впервые предложен для обнаружения фитопатогенных вирусов. Среди существующих нескольких модификаций ИФА (прямой, непрямой, «сэндвич»-вариант) в фитовирусологии наиболее распространен «сэндвич»-вариант [5]. При постановке метода иммуноферментного анализа для диагностики ВЯДЯ

с использованием полученной нами высокоспецифической антисыворотки необходимо было выделить фракцию иммуноглобулинов IgG и приготовить конъюгат [3].

Выделение фракции иммуноглобулинов IgG мы проводили методом аффинной хроматографии с применением в качестве сорбента protein A sepharose CL-4B фирмы SERVA(USA). В это же время нами проводились работы с применением BrCN активированной сефарозы в целях получения сорбента, который мы использовали для выделения иммуноглобулинов IgG из антисывороток. Для приготовления конъюгата комплекса иммуноглобулинов с ферментом мы использовали щелочную фосфатазу активностью 10 000 KU фирмы SIGMA (USA).

Обсуждение результатов. При разработке условий проведения ИФА ВЯДЯ изучали различные концентрации иммуноглобулинов и разведения конъюгата. При различных разведениях иммуноглобулинов и конъюгата получили разные показания оптической плотности. Данные приведены в табл. 1.

Таблица 1 – Показания оптической плотности при различных разведениях IgG и конъюгата при длине волны 405 нм

IgG \ Конъюгат	1:500	1:750	1:1000
1:500	0,72	0,78	0,94
1:750	0,78	0,78	1,08
1:1000	0,85	0,72	0,98

Для сенсibilизации микроплат использовали иммуноглобулины в разведении 1:500; 1:750; 1:1000. Иммуноглобулины разводили в карбонатном буфере pH-9,6. Адсорбцию антител на микроплатах проводили в течение ночи в холодильнике при температуре +4 °C или 30 мин в термостате при +37 °C. В процессе приготовления конъюгата, во время диализа изменяется объем глобулинов, поэтому конъюгат мы применяли не в абсолютной концентрации, а в разведениях 1:500; 1:750; 1:1000.

Оптимизацию ИФА проводили с использованием сырого сока индикаторного растения *Nicotiana occidentalis* 37В. Оптимальные показания оптической плотности (экстинции) при длине волны 405 нм были зафиксированы при разведении иммуноглобулинов в соотношении 1:1000, разведении конъюгата 1:750 и разведении сока 1:10. Аналогичные результаты мы получили и при разведении иммуноглобулинов и конъюгата, полученных с использованием BrCN активированной Сефарозы с протеином А в качестве сорбента.

Нами был проведен эксперимент по проведению трехстадийного варианта ИФА. Метод заключается в последовательном инкубировании иммуноглобулинов, экстракта растительного сока и конъюгата. Одновременно нами был заложен эксперимент по проведению двухстадийного варианта ИФА, который заключался в совместном инкубировании экстракта растительного сока и конъюгата. При этом в двухстадийном ИФА использовались те же буферные смеси, что и в трехстадийном варианте ИФА. Результаты проведенных экспериментов представлены на рис. 1, 2.

Из данных, отображенных на рис. 1, видно, что наивысшее показание оптической плотности (экстинции) мы получили в варианте ИФА с применением трех стадий инкубаций. Первая стадия заключается в сенсibilизации микроплат иммуноглобулинами в различном разведении. Адсорбцию проводили в течение 3-х часов при температуре +37 °C в термостате. Далее проводили трехразовую промывку микроплат промывочным буфером. На второй ста-

дии проводили инкубацию растительного экстракта, полученного из листьев индикаторного растения *Nicotiana occidentalis* 37B с симптомами вируса ямчатости древесины яблони. Гомогенизированный и осветленный низкоскоростным центрифугированием растительный экстракт инкубировали в течение 3 часов при температуре +37 °С в термостате.

После инкубации проводили трехразовую промывку микроплат промывочным буфером. Заключительная стадия состоит в инкубировании конъюгата в различных разведениях, которую проводили в течение 3 часов при температуре +37 °С в термостате. После инкубирования конъюгата проводили трехразовую промывку и наносили субстратный буфер, состоящий из диэтаноламина и нитрофенилфосфата. Через 30 мин снимали показания оптической плотности при длине волны 405 нм.

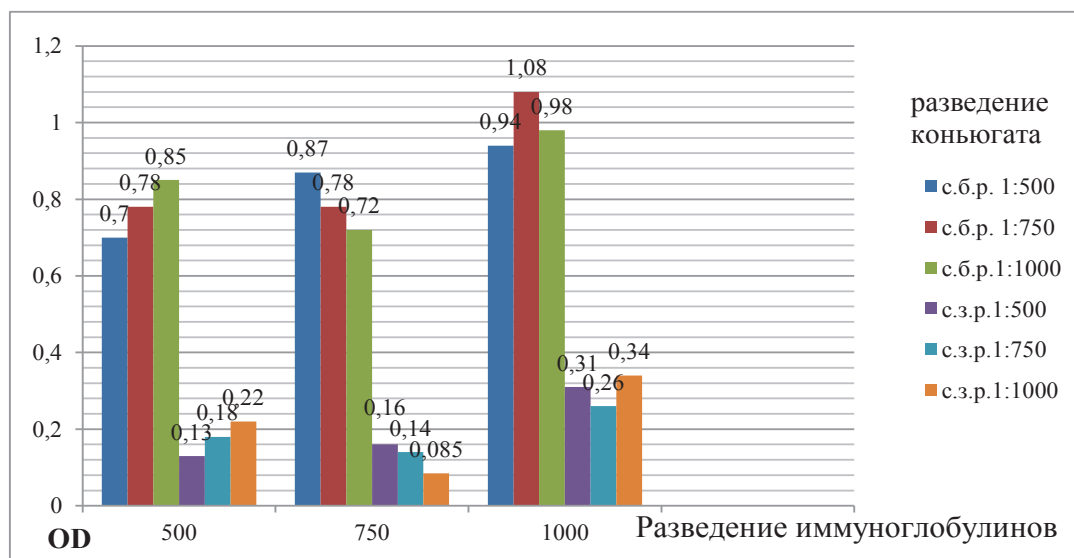


Рис. 1. Результаты оптимизации ИФА с тремя стадиями инкубации:
с.б.р. – сок больного растения; с.з.р. – сок здорового растения;
OD – показания оптической плотности

В результате оптимизации ИФА вируса ВЯДЯ наивысшие показания оптической плотности получены при разведении иммуноглобулинов 1:1000, конъюгата 1:750 и растительного сока в соотношении 1:10. Данные разведения являются оптимальными для проведения иммуноферментного анализа молдавского изолята вируса ямчатости древесины яблони. На рис. 2 показаны результаты применения двухстадийного варианта проведения ИФА.

Исследования заключались в инкубировании конъюгата вместе с экстрактом растительного сока после сенсibilизации иммуноглобулинов на микроплаты. За основу были взяты те же разведения иммуноглобулинов, конъюгата и растительного сока, буферные растворы, что и в варианте проведения ИФА с применением трех стадий инкубации. Полученные нами показания оптической плотности после окончания реакции привели нас к выводу о нецелесообразности применения данного двухстадийного варианта ИФА, для диагностики исследуемого нитевидного вируса ямчатости древесины яблони. Нестабильные показания оптической плотности нами также были получены в исследованиях по испытанию непрямого метода иммуноферментного анализа для диагностики ВЯДЯ.

Таким образом, испытания различных вариантов проведения иммуноферментного анализа показали, что для получения надежных результатов диагностику ВЯДЯ необходимо проводить согласно «сэндвич»-варианту ИФА, выполняя следующие последовательные

этапы: сенсibilизация микроплат иммуноглобулинами в разведении 1:1000; разведение растительного сока в соотношении 1:10; использование конъюгата в разведении 1:750. Режимы инкубирования на всех стадиях – 3 часа в термостате при температуре +37 °С.

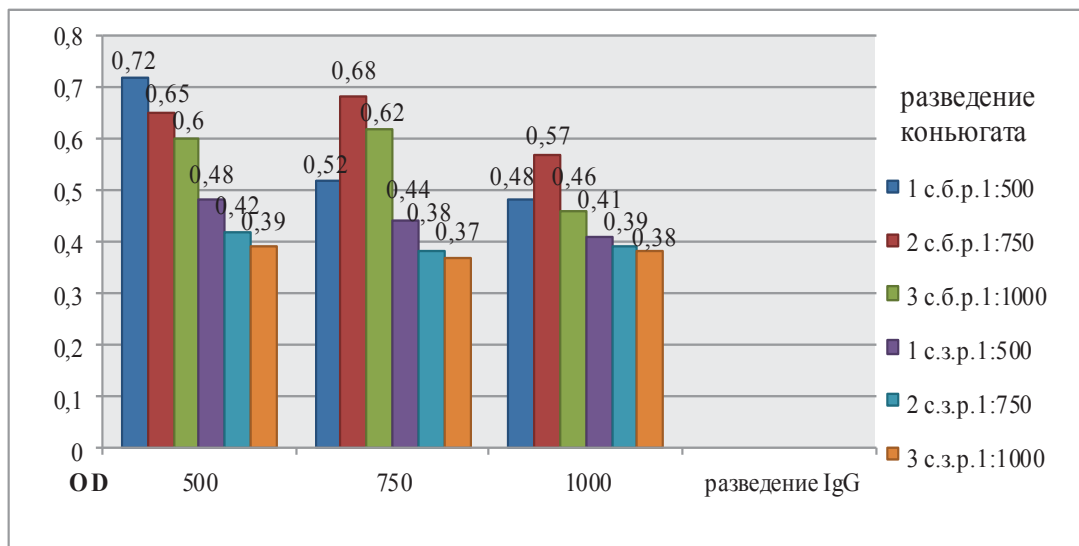


Рис. 2. Результаты оптимизации ИФА с двумя стадиями инкубации: с.б.р. – сок больного растения; с.з.р. – сок здорового растения; OD – показания оптической плотности

Выводы. Диагностику ВЯДЯ необходимо проводить согласно «сэндвич»-варианту ИФА, выполняя следующие этапы: сенсibilизация микроплат иммуноглобулинами в разведении 1:1000; разведение растительного сока в соотношении 1:10; использование конъюгата в разведении 1:750. Режимы инкубирования на всех стадиях – 3 часа в термостате при температуре +37 °С. Полученные результаты позволяют рекомендовать применение метода иммуноферментного анализа (ИФА) для диагностики вируса ямчатости древесины яблони в системе сертификации плодового посадочного материала семечковых культур.

Литература

1. Вердеревская, Т.Д. Вирусные заболевания плодовых культур и винограда и пути решения проблемы создания свободных от вирусов насаждений / Т.Д. Вердеревская, Г.Я. Рудь // Доклады семинара ФАО стран Средиземноморья по защите плодовых и винограда от вредителей и болезней. – Москва, 1969. – С. 11–18, 2.
2. Калашян, Ю. Вирус ямчатости древесины яблони в Молдове / Ю. Калашян, А. Чернец, В. Лукица, Л. Проданюк [и др.]. – Вестник Киевского национального университета имени Тараса Шевченко. – 2012. – № 62. – С. 61–64.
3. Будзанівська І.Г., Поліщук В.П. Філогенетичний аналіз РНК вмісних вірусів рослин, що циркулюють на території України. ПП Формат, 2014, 225 с.
4. Engvall E., Perlmann P. Enzyme – linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. In: Journal Imunochem, 1971, vol. 8(4), p. 871–874.
5. Clark M.F., Adams A.N., Barbara D.J. The detection of plant viruses by enzyme- linked immunosorbent assay (ELISA). In: Acta Horticulturae, 1976, vol. 67(1), p. 43–49.