

## ПОЛУЧЕНИЕ И ИММУНОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ К X-ВИРУСУ КАРТОФЕЛЯ

С.З. Ескендилова, Н.И. Сарина, Е. Манат

*Национальный центр биотехнологии, ул. Ш. Валиханова, 13/1, Астана, 010000, Казахстан  
lii@biocenter.kz*

### АБСТРАКТ

Массовая диагностика вирусных заболеваний является ключевым звеном для фитосанитарного мониторинга и фитосанитарной селекции, для сертификации посадочного материала и для карантинных мероприятий. Иммуноферментный анализ (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) по сей день является наиболее распространенным и широко используемым методом анализа растительного материала для диагностики и идентификации патогенов. В качестве основного иммунореагента в твердофазном иммуноферментном анализе применяют поликлональные антисыворотки, полученные иммунизацией кроликов очищенными вирусными препаратами. Однако серьезную проблему при применении антисывороток для идентификации и количественного определения антигенов в различных областях исследований представляют воспроизводимость, неспецифическое связывание и перекрестная реактивность антител. В настоящее время моноклональные антитела как иммунореагенты используются в диагностике многих бактериальных и вирусных болезней растений. Моноклональные антитела по специфичности и чувствительности обнаружения патогена в биологических жидкостях значительно превосходят поликлональные антисыворотки.

Методом гибридомной технологии получены штаммы гибридных культивируемых клеток, стабильно продуцирующие высокоаффинные моноклональные антитела к очищенному препарату X-вируса картофеля. Результаты иммунохимической характеристики моноклональных антител свидетельствуют о специфичности к эпитопу капсидного белка X-вируса картофеля, что обуславливает возможность их использования как высокочувствительных и специфичных иммунореагентов для разработки диагностических тест-систем.

**Ключевые слова:** вирус картофеля, моноклональные антитела, гибридизация, специфичность, культивирование.

## OBTAINING AND IMMUNOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF MONOCLONAL ANTIBODIES TO X-VIRUS OF POTATO

S.Z. Eskendirova, N. I. Sarina, Y. Manat

*National Center for Biotechnology, 13/1 Valikhanov str., Astana, 010000, Kazakhstan*

*lii@biocenter.kz*

### ABSTRACT

Modern potato seed multiplication systems on the virus-free basis provide a diagnostic control of viral infection at different stages of seed multiplication process to ensure the timely removal of infected planting material batches. Therefore, mass diagnosis of viral diseases is a key element for pest monitoring and plant breeding, for certification of planting material and quarantine measures. Enzyme-linked immunosorbent assay is currently the most common and widely used method of analysis of plant material for diagnosis and identification of pathogens. As the main immunoreagent in a solid phase of enzyme-linked immunosorbent assay there are used polyclonal antisera obtained by means of rabbits immunization using purified viral preparations. However, a serious problem in the application of antisera for identification and quantification of antigens in different areas of research is caused by reproducibility, non-specific binding and cross-reactivity of antibodies. Currently, monoclonal antibodies are used as immunoreagents in diagnostics of many viral and bacterial diseases of plants. Monoclonal antibodies significantly

**prevail over polyclonal antiserum in the means of specificity and sensitivity of pathogen detection in biological liquids.**

**The method of hybridoma technology has been used to produce strains of the cultured hybrid cells that sustainably produce high-affinity monoclonal antibodies to the purified preparation of potato X-virus. The results of immunochemical characteristics of monoclonal antibodies show specificity to the epitope of the capsid protein of potato X-virus, which leads to possibility of their use as a highly sensitive and specific immunoreagents for development of diagnostic test systems.**

**Keywords: potato virus, monoclonal antibodies, hybridization, specificity, cultivation**

## **ВВЕДЕНИЕ**

X-вирус картофеля (*PVX*) широко распространен во всем мире и относится к числу наиболее вредоносных агентов, поражающих культуру картофеля. Инфицирование ХВК рассматривается как существенный фактор, который может уменьшить урожай картофеля более чем на 25-30%.

Диагностика и идентификация вирусов является важным элементом в сфере защиты растений от болезней. Глобализация сельского хозяйства в последние десятилетия, расширение международного обмена семенным и посадочным материалом способствовали интродукции вирусов картофеля в новые регионы. Высокая изменчивость вирусов в природе в результате генетической рекомбинации и мутации под влиянием биолого-экологических факторов также способствовала образованию новых более агрессивных изолятов и ослаблению свойств известных изолятов [1, 2].

Современные системы ведения семеноводства картофеля на оздоровленной безвирусной основе предусматривают проведение диагностического контроля вирусного поражения на различных этапах семеноводческого процесса с целью своевременного удаления инфицированных партий посадочного материала. Поэтому массовая диагностика вирусных заболеваний является ключевым звеном для фитосанитарного мониторинга и фитосанитарной селекции, для сертификации посадочного материала и для карантинных мероприятий [1, 2].

Успешное решение проблем безвирусного растениеводства зависит от доступности быстрых, чувствительных, специфичных, легко-выполнимых и недорогих методов детекции и идентификации вирусов. Следует подчеркнуть, что, как показывает весь мировой опыт, затраты на диагностику несоизмеримы с потерями от заражения вирусами и с расходами на искоренение инфекции [1, 2].

Еще два десятилетия назад методы диагностики инфекций у растений были довольно трудоемкими и занимали много времени. Использование растений-индикаторов для идентификации вирусов, специальных сред для выявления бактерий и другие традиционные методы анализа занимали дни, а в ряде случаев, недели и месяцы. Единственным методом массовой лабораторной диагностики фитопатогенных вирусов был серологический метод, основанный на преципитации вирусных частиц антителами иммунной сыворотки в жидкой среде (т.н. «*drop precipitation test*», известный в России как «капельный метод диагностики»), который использовали для выявления четырех вирусов картофеля в листьях сильно зараженных растений. Однако, чувствительность капельного метода оказалась недостаточна для выявления вирусов в пробирочных растениях, получаемых при оздоровлении сорта методом культуры меристем. Поэтому его применение на ранних стадиях оздоровления и вегетативного размножения оздоровленного материала было неэффективным. Кроме того, ассортимент имеющихся антисывороток совершенно не отвечал реальным потребностям безвирусного растениеводства [3, 4].

К настоящему времени разработаны различные методы детекции вирусов, большинство из которых основано на обнаружении вирусспецифических антигенов (иммунохимические методы) или вирусной нуклеиновой кислоты (молекулярные методы). Доминирующими в лабораторной диагностике вирусов являются метод иммуноферментного анализа (ИФА), различные варианты полимеразной цепной реакции (ПЦР) и молекулярно-гибридизационный анализ (МГА), ввиду их высокой чувствительности, специфичности и производительности [5, 6].

Иммуноферментный анализ (ИФА) (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA) по сей день является наиболее распространенным и широко используемым методом анализа растительного материала для диагностики и идентификации патогенов. При постановке ИФА тестов используется целый ряд технологий и модификаций с использованием биотиниликованных и конъюгированных с щелочной фосфатазой или пероксидазой поликлональных антител в так называемых прямом методе, двойном и тройном сэндвичах и др. [5, 7-9]. В качестве основного иммунореагента в твердофазном ИФА применяют поликлональные антисыворотки, полученные иммунизацией кроликов очищенными вирусными препаратами. Однако серьезную проблему при применении антисывороток для идентификации и количественного определения антигенов в различных областях исследований представляют воспроизводимость, неспецифическое связывание и перекрестная реактивность антител.

Разработка диагностикумов нового поколения стала возможной на основе использования достижений современной биотехнологии – гибридной технологии, позволившей получать моноклональные антитела (МКА), идентичные по всем параметрам, взаимодействующие с уникальной детерминантой антигена и доступные в неограниченном количестве. В настоящее время моноклональные антитела как иммунореагенты используются в диагностике многих бактериальных и вирусных болезней растений. МКА по специфичности и чувствительности обнаружения патогена в биологических жидкостях значительно превосходят поликлональные антисыворотки. Преимущества моноклональных антител обусловлены в первую очередь тем, что препараты МКА характеризуются свойствами химически однородной системы. Это означает, что все молекулы антител в таком препарате в структурном отношении полностью идентичны между собой и все обладают способностью связываться с одним и тем же участком молекулы антигена. Благодаря тщательному скринингу и отбору клонов антител, обладающих сродством к определенной детерминанте искомого антигена, удается свести к минимуму нежелательную активность препаратов антител. Гибридные клетки, продуцирующие моноклональные антитела, фактически бессмертны. Они прекрасно приспособлены для роста в культуре или опухолевого развития в организме животного. Применяя стандартные методы работы с культурами клеток, можно обеспечить практически неограниченную наработку моноклональных антител. Это важнейшее преимущество МКА по сравнению с поликлональными антителами с точки зрения возможностей их применения в иммунохимическом анализе. В процессе клонирования и отбора исследователь может выбрать гибридомы с желательными для него свойствами в отношении специфичности взаимодействия, констант аффинности, физико-химических свойств, влияющих на возможности их использования в анализе. Получить поликлональные антитела с нужными свойствами из сыворотки животных значительно труднее. Высокая специфичность моноклональных антител позволяет создать эффективные диагностикумы для определения антигенов, которые имеются в ограниченных количествах [10-13].

В доступной литературе описано получение Togrance L. с соавторами (1986) штаммов гибридом – продуцентов моноклональных антител к X-вирусу картофеля, полученных в результате гибридизации спленоцитов крыс линии LOU/lap, иммунизированных

изолятами X-вируса картофеля и миеломных клеток Y3Ag1.2.3. Для характеристики специфичности гибридом были использованы 33 изолята X-вируса картофеля, различающихся по степени патогенности и географической распространенности (Южная и Северная Америка, Европа). МКА девяти штаммов гибридом реагировала со всеми 33 изолятами X-вируса картофеля с различной активностью. Лишь одна гибридома МКАС67 специфически взаимодействовала только с двумя изолятами X-вируса (НВ и СР), имеющих географическое распространение только в регионе Южной Америки [14]. Таким образом, диагностическая значимость МКА67 обусловлена его использованием при проведении диагностических мероприятий по оздоровлению местных сортов картофеля.

Известны мышинные МКА, полученные эстонскими исследователями Sober J. с соавторами (1988), к Русскому штамму X-вируса картофеля в результате гибридизации спленоцитов BalB/c миеломной линией [15]. Авторами были отобраны и охарактеризованы 3 штамма высокоспецифичных гибридом – 21XB4, 21XD2 и 23XA5. Испытуемые МКА взаимодействовали со всеми использованными для тестирования изолятами X-вируса, распространенных на территории СССР, и не вступали в перекрестную реакцию с Y-, S-, M-вирусами картофеля и вирусом табачной мозаики. Уровень чувствительности испытуемых МКА в сэндвич ИФА достигала 10-20 нг/мл. Показатели константы связывания (аффинности) МКА составили для 21XB4 –  $1,5 \times 10^{-10}$  М, 21XD2 –  $1,2 \times 10^{-9}$  М и 23XA5 –  $1,0 \times 10^{-9}$  М, что определило их высокую диагностическую эффективность при детекции X-вируса в листьях и клубнях зараженных и здоровых растений картофеля.

Целью настоящей работы является получение и иммунохимическая характеристика моноклональных антител к очищенному препарату вируса картофеля PVX как высокочувствительных и специфичных иммунореагентов для разработки диагностических тест-систем.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для работы был использован очищенный препарат вируса картофеля PVX (изолят PVX-Красавчик). При выполнении исследований были использованы следующие виды животных: 10 мышей беспородных и 6 мышей линии BALB/c 6-8-недельного возраста.

Мыши линии BALB/c, иммунизированные очищенным препаратом вируса картофеля PVX, использовались нами в гибридной технике как продуценты антителопродуцирующих лимфоцитов. Беспородные мыши служили источником перитонеальных макрофагов при создании «питающего слоя» клеток на поверхности лунок.

*Иммунизация мышей.* Мышам линии BALB/c в первый день иммунизации вводили внутривентриально по 100 мкг антигена в 0,1 мл неполного адьюванта Фрейнда (Gibco, США). На 7, 11, 12, 13 дни иммунизации животным инъецировали по 100 мкг антигена в забуференном физиологическом растворе, pH 7,2-7,4. Через три дня после последней иммунизации сыворотка крови иммунизированных мышей исследовалась на наличие антител методом иммуноферментного анализа. При достаточно высоком титре антител в сыворотке крови спленоциты использовались для гибридизации.

*Гибридизация (слияние) клеток.* Гибридизацию клеток миеломы X63Ag8.653 и иммунных спленоцитов проводили по методу V.Oi, L. Herzenberg (1980) [16].

Гибридизацию проводили путем слияния лимфоцитов мышей линии BALB/c, стимулированных антигеном PVX. В качестве сливающего агента использовали 45% раствор полиэтиленгликоля-4000. Для культивирования клеточных культур использовали среду RPMI – 1640 с добавлением 10% фетальной сыворотки плода коровы, 0,05 мл/л

DOI: 10.11134/btp.4.2014.5

пирувата натрия, 0,002 мл/л 2-меркаптоэтанола. Селекцию гибридных клеток проводили в среде, содержащей гипоксантин, аминоптерин, тимидин.

*Определение продуктивности штаммов гибридом.* Продуктивность штаммов гибридом определяли в течение 8 дней. Гибридные клетки высевали в 8 лунок 24-луночного планшета в количестве  $2 \times 10^5$  клеток на лунку. Гибридомы культивировали в полной ростовой среде RPMI-1640. С 1 по 8 день с одной лунки в день отбирали культуральную среду для определения антителопродуцирующей активности гибридом методом ИФА.

Клонирование гибридных культивируемых клеток проводили методом лимитирующих разведений [17].

Антительную продуктивность гибридом определяли в непрямом ИФА с использованием очищенного препарата вируса картофеля PVX.

*Постановка непрямого ИФА.* В лунки 96-луночного планшета для иммунологических реакции вносили суспензию очищенного вирусного препарата X-вируса картофеля (изолят PVX-Красавчик) в концентрации 0,001 мг/мл, в 0,1 мл ЗФР, pH 7,2-7,4 и выдерживали при  $-4^{\circ}\text{C}$  в течение ночи. Планшет отмывали 3 раза ЗФР, содержащим 0,1% твина-20 (ЗФР-Тв) и 3 раза ЗФР, и в каждую лунку вносили по 0,1 мл 1% раствора бычьего сывороточного альбумина на ЗФР-Тв для блокировки свободных поверхностей твердой фазы. Через 1 час после инкубации при  $37^{\circ}\text{C}$  содержимое лунок удаляли и планшет отмывали вышеописанным способом. В лунках двух вертикальных рядов планшета готовили двукратные разведения исследуемой культуральной жидкости (КЖ) (1:2 и более) и асцитной жидкости (1:100 и более) в 0,1 мл ЗФР-Тв. Одновременно ставили контроли: с культуральной жидкостью миеломных клеток в тех же разведениях и с ЗФР-Тв. Планшет инкубировали в термостате при  $37^{\circ}\text{C}$  в течение 1 часа. После инкубации содержимое лунок удаляли, повторяли процедуру отмывки планшета и в каждую лунку вносили по 0,1 мл рабочего разведения конъюгата – антител кролика против иммуноглобулинов мышей, меченные пероксидазой хрена, в ЗФР-Тв. Через 1 час после инкубации при  $37^{\circ}\text{C}$  повторяли процедуру отмывки планшета с целью удаления несвязанных продуктов реакции. Наличие антител против X-вируса картофеля определяли количественно по расщеплению субстрата в присутствии хромогена – ортофенилендиамина.

Результаты реакции учитывают на спектрофотометре путем измерения оптической плотности жидкости в каждой лунке при длине волны 492 нм. Титром моноклональных антител считают ее максимальное разведение, величина оптической плотности в котором в 2 и более раза превосходит оптическую плотность в лунках с отрицательным контролем.

*Получение препаративных количеств моноклональных антител.* После двукратного клонирования гибридные клетки наращивали в пластиковых матрацах объемом 25-50 мл в полной ростовой среде, в течение 3-4 дней в  $\text{CO}_2$ -инкубаторе при  $37^{\circ}\text{C}$ . Клетки снимали с поверхности пластика пипетированием и центрифугировали при 1000 оборотах/минуту в течение 7 минут. Осадок клеток ресуспендировали в неполной ростовой среде и вводили  $2 \times 10^6$  клеток внутрибрюшинно мышам линии BALB/c, которым за 7-10 дней до введения гибридомы был инъецирован пристан-2,6,10,14-тетраметилпентадекан (Sigma, США) в дозе по 0,5 мл на голову. После образования асцитной опухоли через 12-14 дней мышь забивали методом цервикальной дислокации. Затем тушку фиксировали на препаравальной доске и препарировали кожу вдоль белой линии живота. Асцитную жидкость собирали из брюшной полости с помощью шприца, затем асцитную жидкость отделяли от гибридных клеток центрифугированием при 1000 об/мин в течение 10 минут. Гибридные клетки ресуспендировали в неполной ростовой среде и после подсчета количества клеток вводили в брюшную полость мышам линии BALB/c для дальнейшего

DOI: 10.11134/btp.4.2014.5

накопления антител. Асцитную жидкость использовали для выделения из нее иммуноглобулинов.

Очистку моноклональных антител из асцитной жидкости осуществляли методом высаливания сульфатом аммония до 50% насыщения. Для этого в асцитную жидкость добавляли равный объем ЗФР с рН 7,2. Затем добавляли равный объем насыщенного раствора сульфата аммония и оставляли при перемешивании на 12 часов при 4°C. Образовавшийся преципитат осаждали центрифугированием при 5000 об/мин в течение 30 минут при 4°C. Осадок антител ресуспендировали в минимальном объеме ЗФР с рН 7,2 и диализовали против ЗФР в течение суток. Очищенные моноклональные антитела в виде асцитной жидкости хранили при -70°C без консерванта или при 4°C с добавлением 0,1% азида натрия. Концентрацию антител в асцитной жидкости определяли по методу M. Bradford (1976).

*Электрофорез и иммуноблотинг.* Электрофорез очищенного препарата Х-вируса картофеля в 12% полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН) на аппарате для вертикального электрофореза «PowerPac», Bio-Rad осуществляли по методу U. Laemmli [18]. Иммуноблотинг проводили по методу Towbin P. et al. [19]. Электрофоретический перенос антигенов из геля на нитроцеллюлозную мембрану осуществляли с помощью аппарата для иммуноблотинга «PowerPac», Bio-Rad при постоянной силе тока 0,8 мА/см<sup>2</sup> в течение одного часа. Для иммунохимического проявления нитроцеллюлозная мембрана последовательно инкубировали в 1% растворе БСА, затем в рабочем разведении раствора испытуемых моноклональных антител и коммерческих антивидовых антител («Sigma», США). Иммунохимическое проявление реакции проводили по расщеплению субстрата - 4-хлор-нафтола.

Константу связывания моноклональных антител определяли методом ИФА по J. Beatty et al. (1987) [20].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для определения серологической активности очищенного препарата вируса картофеля PVX и возможности использования в качестве иммуногена с целью получения штаммов гибридом – продуцентов моноклональных антител проводили иммунизацию мышей линии *Balb/c* по следующей схеме: в первый день иммунизации вводили внутривнутрино по 25 или 50 мкг очищенного препарата вируса картофеля PVX в 0,1 мл полного адьюванта Фрейнда (ПАФ). На 7, 11, 12, 13 дни иммунизации мышам вводили внутривнутрино по 25 или 50 мкг испытуемого антигена в забуференном физиологическом растворе (таблица 1).

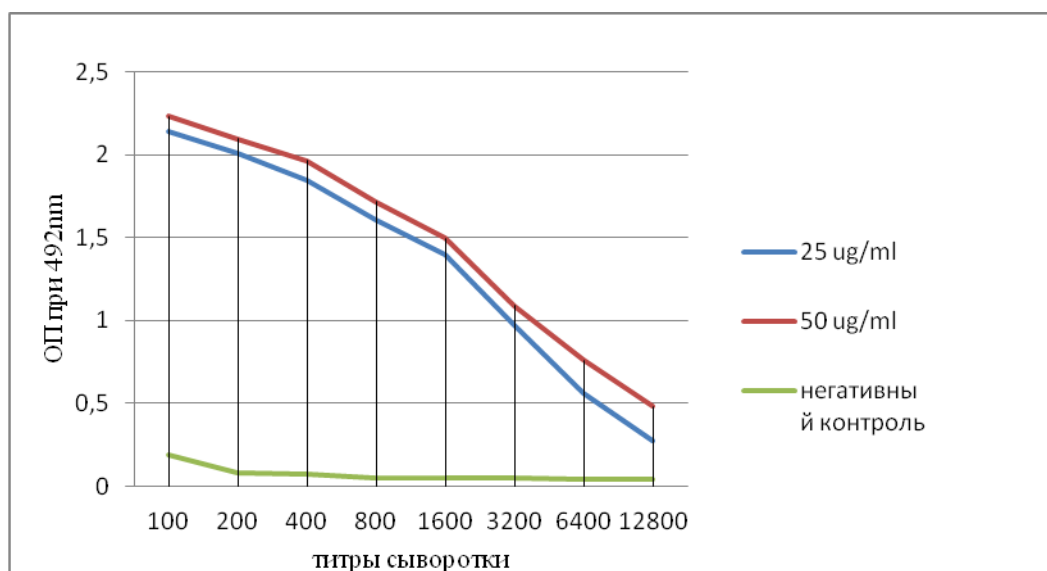
**Таблица 1.** Схема иммунизации мышей линии *Balb/c* очищенным препаратом вируса картофеля PVX

**Table 1.** Scheme of immunization mice *Balb/c* with purified preparation of potato virus PVX

Иммуноген Immunogen	Доза иммуногена The dose of immunogen	Схема иммунизации Immunization schedule
Очищенный препарат вируса картофеля PVX The purified	25 мкг белка 25 g protein	1, 7, 11, 12, 13 дни – внутривнутрино (1 инъекция в смеси с ПАФ, остальные с ЗФР)
	50 мкг белка	
		1, 7, 11, 12, 13 days – intraperitoneal

preparation of potato virus PVX	50 g protein	(1 injection with FCA in a mixture, the rest with PBS)
---------------------------------	--------------	--------------------------------------------------------

Использованная двухнедельная схема иммунизации мышей линии *Balb/c* обеспечила достаточный уровень выработки специфических антител против испытуемого антигена. Высокий уровень специфических антител выявлен в сыворотках крови мышей, иммунизированных очищенным препаратом вируса картофеля *PVX* в концентрации 25 мкг/мл, так и в сыворотках крови мышей, иммунизированных в концентрации 50 мкг/мл – 1:6400-1:12800 (рисунок 1).



**Рис. 1.** Результаты титров специфических антител в сыворотках крови иммунных мышей в ИФА

**Fig. 1.** The results of specific antibodies titers in the blood serum of immunized mice in ELISA

Основной целью процесса иммунизации является индукция клонов В-лимфоцитов, продуцирующих антитела заданной специфичности и их активации в функциональное состояние, при котором они способны сливаться и образовывать антителообразующие гибридные клетки.

**Таблица 2.** Индукция клонов В-лимфоцитов, продуцирующих моноклональные антитела заданной специфичности

**Table 2.** Induction of B-cell clones producing desired monoclonal antibody specificity

Иммуноген Immunogen	Группы мышей Groups of mice	Количество В-лимфоцитов селезенки иммунизированных мышей (n=3), млн. клеток The amount of B lymphocytes of the spleen of immunized mice (n = 3) million. Cells
Очищенный препарат вируса картофеля <i>PVX</i> The purified preparation of potato virus <i>PVX</i>	1	53,3±9,1
	2	37,3±9,0

Как видно из таблицы 2, иммунизация мышей BALB/c очищенным препаратом вируса картофеля PVX оказалась вполне пригодна для стимулирования иммунной системы организма подопытных животных на выработку достаточного количества В-лимфоцитов в селезенках иммунизированных мышей.

Наиболее активная индукция клонов В-лимфоцитов, продуцирующих антитела заданной специфичности при иммунизации очищенным препаратом вируса картофеля PVX, отмечена в первой группе –  $53,3 \pm 9,1$  млн. кл (концентрация антигена 50 мкг/мл), тогда как по второй группе этот показатель составил  $37,3 \pm 9,0$  млн. кл. соответственно (концентрация антигена 25 мкг/мл). Это обусловлено различной стимуляцией гуморального иммунитета подопытных животных в результате варьирования доз иммунизации.

Таким образом, определение специфической активности сывороток крови иммунизированных мышей линий BALB/c с очищенным препаратом вируса картофеля PVX, показало эффективность использованной нами схемы иммунизации. Оптимальное сочетание пяти инъекций способствовало появлению достаточного количества сывороточных антител с высокой степенью их сродства к использованным антигенам. Это указывает на активную индукцию клонов В-лимфоцитов, продуцирующих антитела заданной специфичности.

Для гибридизации отбирали мышей с максимальными титрами антител, селезенки которых были использованы в качестве источника иммунных лимфоцитов. Слияние клеток миеломы с иммунными лимфоцитами проводили по методу V.Oi, et. L. Herzenberg (1980) с помощью полиэтиленгликоля-4000. Клетки миеломы X63-Ag8.6.5.3 в фазе экспоненциального роста сливали и иммунными спленоцитами в соотношении 1:10. Селекцию гибридных клеток проводили на среде ГАТ. Всего проведено пять гибридизаций клеток миеломной линии X63-Ag8.6.5.3 с иммунными лимфоцитами мышей с целью достижения наилучшего результата слияния клеток.

Скрининг гибридом и исследование специфичности их взаимодействия с антигенными детерминантами очищенного препарата вируса картофеля PVX осуществляли на основе непрямого ИФА (таблица 3). Тестирование гибридом на продукцию специфических антител начинали проводить с того момента, когда наблюдалось незначительное пожелтение ростовой среды и клетки гибридом занимали более 30% поверхности лунок.

**Таблица 3.** Результаты гибридизации миеломных клеток со спленоцитами мышей BALB/c, иммунизированных очищенным препаратом вируса картофеля PVX

**Table 3.** Results of hybridization myeloma cells with splenocytes from BALB / c mice immunized with the purified preparation of potato virus PVX

Гибридизация Hybridization	Число засеянных лунок The number of wells seeded	Лунки, в которых наблюдался рост клонов гибридом The wells in which there was an increase hybridoma clones		Выход позитивных клонов продуцентов МКА Exit positive clones producing MKA	
		количество the amount	%	количество the amount	%
1	576	397	68,9	38	9,57
2	480	302	62,9	36	11,9
3	384	224	58,3	29	12,9
4	384	187	48,6	21	11,2
5	384	276	71,8	25	9,5



Итого Total	2208	1386	62,7	149	10,7
----------------	------	------	------	-----	------

Как видно из таблицы 3, наблюдалась высокая эффективность пяти гибридизации миеломной линии со спленоцитами мышей, иммунизированных очищенным препаратом вируса картофеля PVX. Так, максимальный рост гибридом наблюдался в 1386 лунках из 2208 засеянных, т.е. общий процент слияния клеток был сравнительно высок (62,7%).

Достигнутая нами высокая степень гибридизации клеток позволила начать скрининг гибридом с целью выявления среди них антителообразующих клонов. При исследовании культуральной жидкости (супернатанта) антительная активность по отношению к PVX в иммуноферментном анализе была установлена у 149 клонов из 1386 образовавшихся гибридом, что составляет 10,7%.

Таким образом, выход позитивных клонов из общего числа полученных гибридом в наших опытах находился в пределах 10,7%, что свидетельствует о довольно высоком иммунном фоне пула В-лимфоцитов и о возможности изолирования активных клонов с желаемыми свойствами.

В целях отбора для дальнейшего исследования клонов, стабильно продуцирующих моноклональные антитела (МКА), активность полученных гибридом была проверена пять раз с помощью иммуноферментного анализа с интервалом 3-4 дня (таблица 4).

**Таблица 4.** Стабильность продукции моноклональных антител клонами гибридом в течение 5 пассажей

**Table 4.** Stability production of monoclonal antibodies Hybridoma clones for 5 passages

№ гибридизации № hybridization	Количество позитивных гибридом по результатам тестирования The number of positive test result for a hybrid				
	1	2	3	4	5
1	$\frac{38}{0.658 \pm 0.419}$	$\frac{13}{0.763 \pm 0.439}$	$\frac{8}{0.991 \pm 0.327}$	$\frac{2}{1.782 \pm 0.292}$	$\frac{1}{2.377}$
2	$\frac{36}{0.599 \pm 0.317}$	$\frac{13}{0.776 \pm 0.569}$	$\frac{5}{0.916 \pm 0.534}$	$\frac{1}{1.340}$	$\frac{1}{1.829}$
3	$\frac{29}{0.415 \pm 0.277}$	$\frac{7}{0.618 \pm 0.424}$ <sup>0</sup>	$\frac{2}{0.728 \pm 0.185}$	$\frac{1}{1.243}$	$\frac{1}{1.487}$
4	$\frac{25}{0.543 \pm 0.244}$	$\frac{17}{0.605 \pm 0.398}$	$\frac{9}{0.735 \pm 0.392}$	$\frac{1}{0.843}$	-
5	$\frac{17}{0.462 \pm 0.259}$	$\frac{10}{0.656 \pm 0.442}$	$\frac{3}{0.708 \pm 0.619}$	$\frac{1}{1.892}$	$\frac{1}{1.953}$

Примечание: В числителе – количество гибридом; в знаменателе – средние показатели оптической плотности культуральной жидкости.

Note: The numerator – number of hybridomas; denominator – average optical density of the culture liquid

Продукция антител вышеупомянутыми клонами, положительными по отношению к PVX, наблюдалась в течение трех тестирований. Однако при четвертом скрининге 84,6% гибридом потеряли способность к взаимодействию с искомым антигеном или выявлялись в начальных титрах (1:2 и 1:4). Стабильную секрецию специфических иммуноглобулинов

показали лишь 4 клона гибридом (2F9, 5H8, 7C11, 8G7), у которых максимальные титры надосадочной культуральной жидкости стабильно находились в пределах 1:64 – 1:256.

Клетки гибридом культивируются в среде RPMI-1640, которая содержит 10% сыворотки эмбриона коров; 20 мл/л 200 мМ L-глутамина; Перес – 3,375 г/л; 2-меркаптоэтанол – 3 мкл/л; 10 мл/л пирувата натрия; бикарбоната натрия – 3,7 г/л. Обязательным условием культивирования клеток является 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>, при котором клетки растут в виде стационарной суспензии. Посевная концентрация клеток – 2×10<sup>5</sup> в 1 мл. Частота пассирования – 3-4 суток.

Гибридные клетки представляют собой слабо прикрепляющиеся к носителю округлые клетки размером с исходную миеломную клетку. Ядро занимает большую часть клетки. Цитоплазма имеет вид тонкого ободка.

Продуктивность гибридом в условиях *in vitro* определялась в течение 8 дней. Продуктивность гибридом определяли в течение 8 дней по накоплению антител в культуральной жидкости (супернатанте клеток) – от 25 мкг/мл (1 сутки) до 125-250 мкг/мл (7-8 сутки культивирования), что свидетельствует о устойчивом синтезе МКА клетками испытываемых гибридом *in vitro* (рисунок 2).

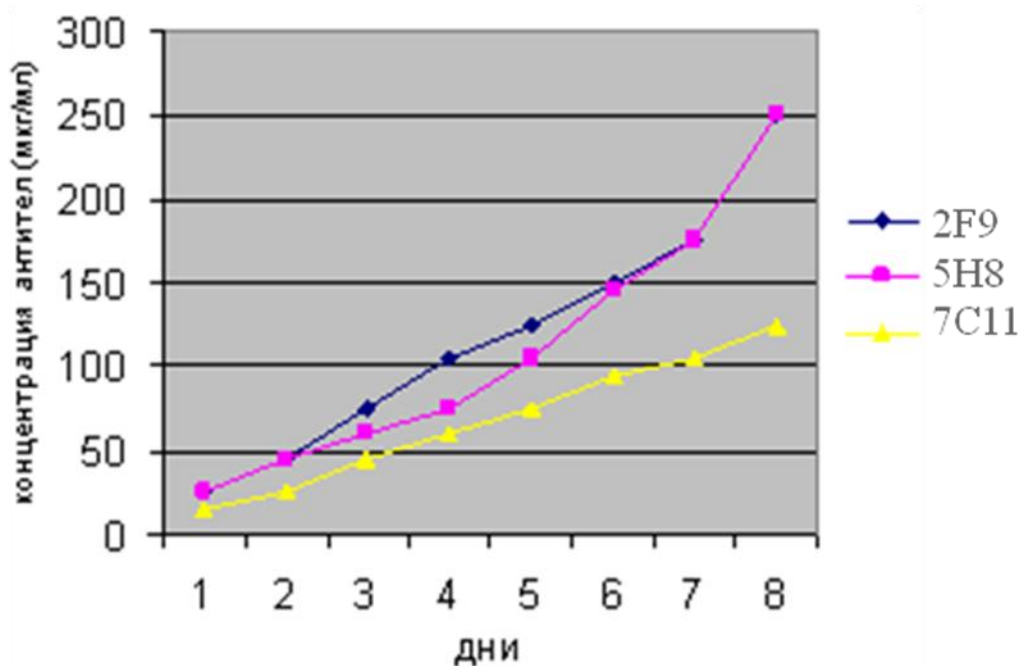


Рис. 2. Продуктивность штаммов гибридом 2F9, 5H8, 7C11 *in vitro*

Fig. 2. The productivity of hybrid strains 2F9, 5H8, 7C11 *in vitro*

Клоны клеток 2F9, 5H8, 7C11, как наиболее активные и стабильные линии гибридом, были подвергнуты клонированию методом лимитирующих разведений. Результаты клонирования показали достаточно высокую генетическую однородность отобранных субклонов, так как от 88,2 до 94,4% субклонов сохранили синтез иммуноглобулинов, имеющих сродство к эпитопам вирусных препаратов картофеля. Предельные разведения надосадочной культуральной жидкости всех субклонов гибридом 2F9, 5H8, 7C11, при которых еще обнаруживалось связывание антител, находились в пределах 1:64-1:256 (таблица 5).

**Таблица 5.** Результаты клонирования штаммов гибридом – продуцентов моноклональных антител**Table 5.** Results of cloning strains of hybridoma producing monoclonal antibodies

Наименование клона The name of clone	Количество субклонов The amount of subclones	Количество позитивных субклонов Number positive subclones	Активность субклонов, % Activity subclones	Предельный титр субклонов Limit titer subclones	Наименование субклонов Name subclones
2F9	34	30	88.2	1:64-1:128	2F9H4
5H8	29	25	85,9	1:32-1:64	5H8A9
7C11	36	34	94,4	1:64-1:128	7C11C4

Асцитные жидкости получали культивированием клеток гибридом в брюшной полости сингенных мышей, предварительно обработанных пристаном (2, 6, 10,1 4-тетраметилпентадекан).

**Таблица 6.** Условия образования асцитной жидкости штамма гибридом при внутривнутрибрюшинной прививке сингенным мышам**Table 6.** Conditions of formation of ascites fluid hybrid strain intraperitoneal inoculation into syngeneic mice

Штамм гибридомы Strain hybridoma	Параметры асцитобразования Parameters of ascitesformation					
	Доза клеток при прививке, кл/мл The dose of cells by grafting, cells / ml	Способ введения Method of injection	Прививаемость асцитных опухолей, % Instills bridge ascites tumors,%	Сроки образования асцитной жидкости, сут. Terms formation ascites liquid, day.	Количество асцитной жидкости, мл The amount of ascites liquid ml	Переживаемость Take
2F9H4	$2 \times 10^6$	в/б	95	9	2,5	+
5H8A9	$2 \times 10^6$	в/б	87	11	1,7	+
7C11G9	$2 \times 10^6$	в/б	54	17	0,9	+

При внутривнутрибрюшинной прививке сингенным мышам штаммов гибридом сроки образования асцитных опухолей колебались от 9 суток (штамм гибридомы 2F9) до 17 суток (штамм гибридомы 7C11). Доза клеток гибридом при прививке составляла  $2 \times 10^6$  кл/мл.

Испытуемые штаммы гибридом прошли 5 пассажей на сингенных мышах и характеризовались различной прививаемостью асцитной опухоли. Так, доля мышей, у которых возникали опухоли, варьировала от 54% при введении клеток штамма 7C11, до 95% при введении клеток штамма 2F9. Количество асцитной жидкости также было разным – от 0,9 мл (штамм гибридомы 7C11) до 2,5 мл (штамм гибридомы 2F9) (таблица 6).

Таким образом, гибридомы 2F9 и 5H8 обладали более активной способностью перевиваться в виде асцитной опухоли из мыши в мышь, нежели 7C11. Это способность гибридом к серийным пассажам на мышах была использована для накопления препаративного количества МКА.

**Таблица 7.** Основные иммунохимические свойства моноклональных антител

**Table 7.** Basic immunochemical properties of monoclonal antibodies

Наименование моноклональных антител Name of monoclonal antibodies	Субкласс антител Subclass antibodies	Титр антител в культуре клеток The antibody titer in the cell culture	Титр антител после очистки сульфатом аммония Antibody titer after purification by ammonium sulfate	Константа связывания The binding constant
2F9	IgG <sub>1</sub>	1:256	1:204800	$2,5 \times 10^{10} \text{M}^{-1}$
5H8	IgG <sub>1</sub>	1:64	1:25600	$5,0 \times 10^9 \text{M}^{-1}$
7C11	IgG <sub>2a</sub>	1:128	1:51200	$7,5 \times 10^9 \text{M}^{-1}$

Как видно из таблицы 7, культивирование клеток гибридом *in vivo* приводит к значительному увеличению титров моноклональных антител в асцитной жидкости – в 10-12 раз (1:25600-1:204800) в сравнении с аналогичным показателем в условиях *in vitro* (1:64-1:256). Моноклональные антитела (иммуноглобулины) из асцитной жидкости высаливали насыщенным раствором сульфата аммония. Очищенные сульфатом аммония препараты моноклональных антител анализировались методом электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия. Электрофорез показал наличие двух белковых полос с молекулярными массами 67 кД и 29 кД, что соответствует молекулярной массе тяжелой и легкой цепи иммуноглобулинов и свидетельствует о высокой степени очистки асцитной жидкости.

Класс и подкласс моноклональных антител определяли в реакции диффузионной преципитации с моноспецифическими антисыворотками к иммуноглобулинам мыши (*Sigma*). Установлено, что синтезируемые гибридомами моноклональные антитела относятся к иммуноглобулинам класса G – наиболее активного класса иммуноглобулинов в серологических реакциях. Одной из основных характеристик моноклональных антител является определение константы связывания (аффинность), которая характеризует степень химической связи антигенного эпитопа с активным центром молекулы иммуноглобулина. Установлено, что константа связывания моноклональных антител, продуцируемых штаммами гибридом 2F9, 5H8, 7C11, составила от  $5,0 \times 10^9 \text{M}^{-1}$  до  $2,5 \times 10^{10} \text{M}^{-1}$ , что обуславливает их достаточно высокую аффинность.

Результаты опытов по определению специфичности МКА штаммов гибридом 2F9, 5H8, 7C11 в непрямом варианте ИФА представлены в таблице 8.

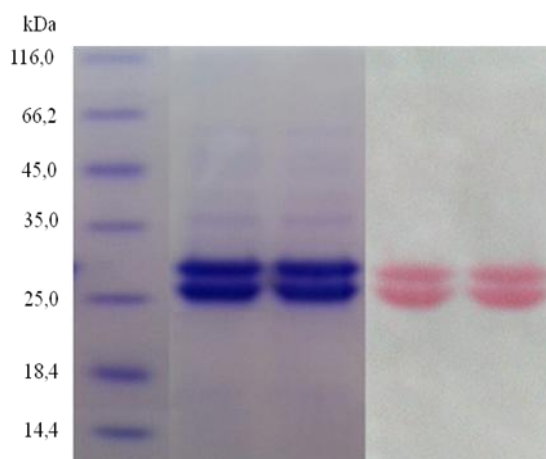
**Таблица 8.** Изучение специфичности и активности моноклональных антител

**Table 8.** Study of the specificity and activity of monoclonal antibodies

Штамм гибридом-производитель МКА Strain-producing hybridomas МКА	Титры моноклональных антител к вирусам картофеля Titers of the monoclonal antibodies to Potato Virus				
	PVX	PVY	PVM	PVL	PVS
2F9	$\frac{1:256}{1:204800}$	-	-	-	-
5H8	$\frac{1:64}{1:25600}$	-	-	-	-
7C11	$\frac{1:128}{1:51200}$	-	-	-	-

Как видно из таблицы 8, титры МКА штаммов гибридом 2F9, 5H8, 7C11 в непрямом варианте ИФА как в культуральной жидкости, так и в асцитной жидкости к очищенному препарату вируса картофеля *PVX* были достаточно высокими – 1:64 – 1:256 и 1:12800 – 1:204800 соответственно, что свидетельствует о иммунодоминантности выявляемого эпитопа капсидного белка вируса. Отсутствие взаимодействия МКА с другими вирусными препаратами, в том числе *PVY*, *PVM*, *PVL* и *PVS* обуславливает специфичность обнаружения белкового эпитопа, ассоциированного с X-вирусом картофеля.

Для сравнительного иммунохимического анализа испытуемых МКА использовали также метод иммуноблотинга (рисунок 3).



**Рис. 3.** Результаты иммуноблотинга моноклональных антител штамма гибридомы 2F9

**Fig. 3.** The results of immunoblotting of monoclonal antibodies 2F9 hybridoma strain

Специфичность моноклональных антител 2F9 к эпитопу капсидного белка X-вируса картофеля доказана методом иммуноблотинга. Анализ белка нативного препарата *PVX*

DOI: 10.11134/btp.4.2014.5

электрофорезом в ПААГ в присутствии SDS показал наличие двух белковых полос, соответствующих молекулярной массе белка оболочки PVX – 25 кДа. Известно, что белок оболочки PVX при проведении электрофореза в ПААГ в денатурирующих условиях ведет себя аномально. Аномальное поведение белка связано с большим содержанием серина и треонина в N-концевом участке, что приводит к меньшему связыванию с SDS и определению завышенного количества молекулярной массы белка до 27-28 кДа.

Таким образом, результаты иммунохимической характеристики моноклональных антител Mab/PVX-2F9 свидетельствуют о их специфичности к эпитопу капсидного белка X-вируса картофеля, что обуславливает возможность их использования как высокочувствительных и специфичных реагентов для разработки иммуноферментных и иммунохроматографических диагностикомов. Штамм гибридных клеток «Mab/PVX-2F9» депонирован и хранится в РГП «Республиканская коллекция микроорганизмов» под регистрационным номером №С-РКМ-0641.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Методом гибридной технологии получены штаммы гибридных культивируемых клеток, стабильно продуцирующие высокоаффинные моноклональные антитела к очищенному препарату вируса картофеля PVX. Результаты иммунохимической характеристики моноклональных антител свидетельствуют о специфичности к эпитопу капсидного белка X-вируса картофеля (PVX), что обуславливает возможность их использования как высокочувствительных и специфичных иммунореагентов для разработки диагностических тест-систем.

## Финансирование

Работа выполнена по проекту «Разработка иммунохроматографической тест-системы для экспрессной детекции вирусов картофеля» в рамках Межгосударственной целевой программы ЕврАзЭС «Инновационные биотехнологии» на 2012-2014 гг.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Loebenstein G, Berger P.H., Brunt A.A., Lawson R.H. Virus and virus-like diseases of potato and production of seed potatoes // Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. – Boston, London, 2000. – 284 p.
2. Анисимов Б.В., Белов Г.Л., Варицев Ю.А., Еланский С.Н. и др. Защита картофеля от болезней вредителей и сорняков. – М.: Картофелево, 2009. – 272 с.
3. Мэтьюс Р. Вирусы растений. – М.: Мир, 1973. – 520 с.
4. Мэйхи Б. Вирусология. Методы. – М.: Мир, 1988. – 389 с.
5. Егоров А.М., Осипов А.П. и др. Теория и практика иммуноферментного анализа. – М.: Высш. шк., 1991. – 288 с.
6. Дрыгин Ю.Ф., Чирков С.Н., Кондакова О.А. Высокочувствительные технологии молекулярной диагностики вирусных и вирусной инфекции картофеля // Матер. межд. конгресса «Картофель. Россия – 2007». – М.: ФНГУ «Росинформагротех», 2007. – С. 17-25.
7. Трофимец Л.Н., Варицев Ю.А., Князева В.П. и др. Разработка и применение метода иммуноферментного анализа для диагностики вирусных и бактериальных болезней картофеля // Научные труды НИИКХ. – М., 1986. – С. 33-40.
8. Бобкова А.Ф., Блинцов А.Н., Малышенко С.И., Чирков С.Н. Наборы «Пиротест» для лабораторной диагностики вирусов -X, -S, -M, -Y, -A и скручивания листьев

картофеля // Качество семенного картофеля: Учебно-методическое пособие. – М., 2003. – С. 341-341.

9. Бобкова А.Ф., Блинцов А.Н., Чирков С.Н. Пиротест – метод иммуноферментного анализа вирусов картофеля // Аграрная Россия, 2003. – №3. – С. 23-27.

10. Кеннет Р., Мак-Керн Т., Бехтол К. Моноклональные антитела // Гибридомы: новый уровень биологического анализа. – М.: Медицина, 1983. – С. 45-51.

11. Coding D.W. Monoclonal antibodies, principles and practices. – 2<sup>th</sup> ed., – London: Acad Press, 1986. – 187 с.

12. Бутенко Р.Г., Гусев М.И., Киркин А.В. Методы получения моноклональных антител // Клеточная инженерия. – М.: Высшая школа, 1987. – С. 89-120.

13. Фридлянская И.И. Получение моноклональных антител (гибридомная технология) // Методы культивирования клеток. – Л.: Наука, 1987. – С. 194-205.

14. Torrance L., Larkins A. and Butcher W. Characterization of monoclonal antibodies against potato virus X and comparison of serotypes with resistance group // J. Gen. Virol. – 1986. – Vol. 67. – P. 57-67.

15. Sober J., Jarverulg L., Toots I., Radavsky J., Villems R. Antigenic characterization of potato virus X with monoclonal antibody // J. Gen. Virol. – 1988. – Vol. 69. – P. 1799-1807.

16. Oi V., Herzenberg L. Immunoglobulin-producing hybrid cell lines // Selected methods in cellular immunology / Ed. By. Mishell B and Shiigi. – San Francisco, 1980. – P. 351-352.

17. Coding J. Antibody production by hybridoma // J. Immunol. Meth. – 1980. – Vol. 39, №1. – P. 285-308.

18. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. – 1970. – Vol. 227. – P. 680-685.

19. Towbin P.K., Staehelin T., Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets // Proc. Natl. Acad. Sci. – 1979. – Vol. 76, №9. – P. 4350-4354.

20. Beatty J., Beatty P. Measurement of monoclonal antibody affinity by non-competitive immunoassay // J. Immunol. Meth. – 1987. – Vol. 100, №3. – P. 173-179.

## REFERENCES

1. Loebenstein G., Berger P.H., Brunt A.A., Lawson R.H. Virus and virus-like diseases of potato and production of seed potatoes. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. Boston, London, 2000, 284 p.

2. Anisimov B.V., Belov G.L., Vahisev Y.A., Elansky S.N. et al. Protection from potato pests diseases and weeds. M., Kartofelevo, 2009, 272 p.

3. Metews R. Plant viruses. M., Mir, 1973, 520 p.

4. Mayhew B. Virology. Methods. M., Mir, 1988, 389 p.

5. Egorov A.M., Osipov A.P. et al. Theory and practice of enzyme immunoassay. M., Higher. wk., 1991, 288 p.

6. Drygin Y.F., Chirkov S.N., Kondakova O.A. High-technology and molecular diagnosis of viral infections viroidnoy potatoes. Mater. Int. Congress "Potatoes. Russia, 2007". M., FNGU "Rosinformagroteh", 2007, pp. 17-25.

7. Trofimets L.N., Varisev Y.A., Knyazev V.P. et al. Development and application of enzyme immunoassay for the diagnosis of viral and bacterial diseases of potato. Proceedings NIIKH. M., 1986, pp. 33-40.

8. Bobkova A.F., Blintsov A.N., Malysenko S.I., Chirkov S.N. Sets "Pirotest" for laboratory diagnosis of viral -X, -S, -M, -Y, -A and potato leaf roll. The quality of seed potatoes. A teaching aid. M., 2003, pp. 341-341.

9. Bobkova A.F., Blintsov A.N., Chirkov S.N. Pirotest-enzyme immunoassay potato viruses. *Agrarian Russia*, 2003, №3, pp. 23-27.
10. Kenneth R., Mack-Kern T., Behtol. K. Monoclonal antibodies. Hybridomas: a new level of biological analysis. M., Medicine, 1983, pp. 45-51.
11. Coding D.W. Monoclonal antibodies, principles and practices. 2<sup>th</sup>ed. London, Acad Press, 1986, 187 p.
12. Butenko R.G., Gusev M.I., Kirkin A.V. Methods for producing monoclonal antibodies. Cell Engineering. M., Higher shkola, 1987, pp. 89-120.
13. Fridlyanskaya I.I. Monoclonal antibody (hybridoma technology). Methods of cell culturing. L., Science, 1987, pp. 194-205.
14. Torrance L., Larkins A. and Butcher W. Characterization of monoclonal antibodies against potato virus X and comparison of serotypes with resistance group. *J. Gen. Virol*, 1986, vol. 67, pp. 57-67.
15. Sober J., Jarverul L., Toots I., Radavsky J., Villems R. Antigenic characterization of potato virus X with monoclonal antibody. *J. Gen. Virol.*, 1988, vol. 69, pp. 1799-1807.
16. Oi V., Herzenberg L. Immunoglobulin- producing hybrid cell lines. Selected methods in cellular immunology. Ed. By. Mishell B and Shiigi. San Francisco, 1980, pp. 351-352.
17. Coding J. Antibody production by hybridoma. *J. Immunol. Meth.*, 1980, vol. 39, no. 1, pp. 285-308.
18. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, vol. 227, pp. 680-685.
19. Towbin P.K., Staehelin T., Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1979, vol. 76, no. 9, pp. 4350-4354.
20. Beatty J., Beatty P. Measurement of monoclonal antibody affinity by non-competitive immunoassay. *J. Immunol. Meth.*, 1987, vol. 100, no. 3, pp. 173-179.

## ТҮЙІН

Вирустардан сауықтыру негізінде картоп тұқым шаруашылығы үрдістерінің жүргізудің заманауи жүйесі әр түрлі кезеңінде зақымдалған өнім топтамасын уақытында жою мақсатында қошет материалдарды диагностикалық бақылау жүргізу қарастырылады.

Сондықтан да, карантиндік шаралар және қошет материалды сертификаттау кезеңінде, фитосанитарлық сұрыптау мен фитосанитарлық мониторинг үшін басты буын - вирустық ауруларды жаппай диагностикалау болып табылады. Өсімдік материалынан патогендерді идентификациялау және диагностикалау үшін иммуноферменттік талдау (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) осы уақытқа дейін кеңінен таралған және кеңінен қолданылатын талдау әдістеріне жатады. Қатты фазалы иммуноферменттік талдауда негізгі иммунореагент ретінде тазартылған вирусты препараттармен иммунделген қояндардан алынған поликлоналды сарысулар қолданылады. Дегенмен, зерттеудің түрлі салаларында антигендерді сандық анықтау мен идентификациялау үшін сарысуларды қолданғанда, олардың өндірілуі, антиденелермен айқас реакцияға түсуі және телімсіз байланысуы маңызды мәселе болып табылады. Қазіргі уақытта моноклоналды антиденелер иммунореагент ретінде өсімдіктердің көптеген вирустық және бактериалдық ауруларын диагностикалауда қолданылады. Биологиялық сұйықтықта патогенді анықтауда моноклоналды антиденелері телімділігі мен сезімталдылығы бойынша поликлоналды антисарысулардан айтарлықтай асып түседі.

Гибридомдық технология әдісімен картоп Х-вирусының тазартылған препаратына аффинділігі жоғары моноклоналды антиденелерді тұрақты түзетін гибриді өсірілетін жасуша штамдары алынды. Моноклоналды антиденелердің иммунохимиялық



DOI: 10.11134/btp.4.2014.5

сипаттамасының нәтижесі бойынша картоп Х-вирусының капсидті ақуыз эпитопына телімді екенін дәлелдеді, яғни диагностикалық тест-жүйелерді әзірлеуге арналған сезімталдылығы жоғары және телімді иммунореагент ретінде олардың қолданылу мүмкіндігі анықталды.

**Кілтті сөздер:** картоп вирусы, моноклоналды антиденелер, гибридизация, телімділік, өсіру.