

УДК 602.68:57.083-635.2

## ВЫДЕЛЕНИЕ, ОЧИСТКА И ИММУНОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВИРУСНЫХ ПРЕПАРАТОВ КАРТОФЕЛЯ

С.З. Ескендилова, Г.Б. Унышева, Н.И. Сарина, А.А. Какимжанова, Г.К. Магзумова,  
В.К. Каримова

РГП «Национальный центр биотехнологии» КН МОН РК, г. Астана  
saule\_e@mail.ru

Современная диагностика вирусных заболеваний является ключевым звеном в производстве здорового посадочного материала. В массовых масштабах ее используют для фитосанитарного мониторинга и фитосанитарной селекции, для сертификации посадочного материала и для карантинных целей. Кроме того, диагностика нужна для контроля оздоровления картофеля от вирусов и обеспечения селекционной и генно-инженерной работы по выведению новых сортов, устойчивых к вирусной инфекции [1-2].

Основная современная тенденция развития систем иммуноанализа – переход к неинструментальным методам. Хотя инструментальные методы анализа – ИФА и ПЦР – характеризуются высокой степенью точности, они трудоемки, сложны, занимают много времени, требуют высококвалифицированного персонала и дорогостоящего оборудования, что ограничивает их применение кругом хорошо оснащенных центров и лабораторий. Поэтому растет потребность в методически простых и доступных для широкого круга пользователей методах иммуноанализа, позволяющих проводить определение в малооборудованных лабораториях, в полевых и домашних условиях [3-5].

Появление в последние годы экспрессных форматов иммуноанализа, таких как иммунохроматография, иммуночипы и др., со временем анализа 10-20 мин существенно расширяет возможности применения иммунохимических подходов в сельскохозяйственной практике. Принципиальными достоинствами иммунохроматографии являются высокая скорость анализа, исчисляемая минутами, высокая чувствительность, простота подготовки образца и предельная простота выполнения самого анализа, не требующего никакого дополнительного оборудования или реагентов. Методическая простота, экспрессность (10-15 мин) и чувствительность иммунохроматографии обусловила ее активное применение для решения разнообразных диагностических задач [6-8].

С учетом необходимости контроля наиболее распространенных патогенов картофеля - вирусов PVY и PVX для разработки иммунохроматографических тест- систем для экспрессной детекции требуется решение целого ряда методических приемов, связанных с выделением высокоочищенных препаратов вирусов, получением специфических моно-поликлональных антител и оптимизации параметров конструирования тест-полосок.

**Ключевые слова:** вирус картофеля, картофель, детекция, микроклональное размножение.

---

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Инокуляцию, накопление, выделение и очистку вирусов картофеля проводили в лабораториях НЦБ РК в соответствии со стандартной методикой [9-11].

#### *Объекты исследований*

Пробирочные растения картофеля, зараженные вирусами PVX и PVY, были получены из Всероссийского научно-исследовательского института картофельного хозяйства им. А.Г. Лорха (г. Москва).

#### *Методы исследований*

##### *Микроклональное размножение оздоровленного картофеля*

Стерилизацию питательных сред, растительного материала и работу проводили в асептических условиях. Пробирочные растения картофеля размножали микроклонально. В качестве базовой среды для микроклонального размножения использовали питательную среду Мурасиге и Скуга.

Микроклональное размножение пробирочных растений осуществляли с помощью черенкования. Растения, сформировавшие 5-6 листочков, в стерильных условиях разрезали на части (отрезок стебля с листом и пазушной почкой). Черенки погружали на глубину междоузлия в питательные среды либо без гормонов, либо с добавлением ауксинов. Черенки культивировали при температуре 24-25°C днем и ночью, при освещенности 5-6 кЛх и продолжительности фотопериода 16 часов. Рост стебля и корней начинался на 3-4 день после посадки на

питательную среду, а полностью растения формировались через 12-15 дней. Каждое последующее черенкование проводили через 14-20 дней.

Расчеренкованные вирусные пробирочные растения выращивали при температуре 23-25°C и освещенности 5000-8000 люкс в течение 4 недель. Среду стерилизовали автоклавированием в течение 20 минут при 0,7-0,8 атм.

Для массового размножения вирусных пробирочных растений картофеля постоянно проводили микроклональное размножение через каждые 24-28 дней. Выросшие безвирусные пробирочные растения картофеля с 5-6 черенками периодически черенковали и пересаживали в пробирки со свежей питательной средой. Из этих черенков снова вырастали новые пробирочные растения.

#### *Тестирование меристемных линий на наличие вирусов методом иммуноферментного анализа (ИФА)*

Все полученные меристемные линии были протестированы с помощью иммуноферментного анализа на вирусы PVX, PVY, PVS, PVM, PLRV (диагностические наборы Всероссийского научно-исследовательского института картофельного хозяйства им. А.Г. Лорха (г. Москва).

#### *Размножение пробирочных растений картофеля в почвогрунте*

Укоренившиеся пробирочные растения картофеля высаживали в почвогрунт. Для увеличения приживаемости растения накрывали пластиковыми стаканами для создания условий влажной камеры. За высаженными вирусными растениями периодически проводился уход в течение роста. Полив растений проводился водой по мере высыхания почвы.

*Электрофорез в 12% полиакриламидном геле.* Электрофорез вирусных препаратов осуществляли по методу U. Laemmli на аппарате для вертикального электрофореза (Hoefel Scientific, США) с использованием трис-глицинового буфера.

*Атомно-силовая микроскопия.* Визуализация вирусных препаратов методом атомно-силовой микроскопии была выполнена в лаборатории иммунохимии Института Биохимии им. А.С. Баха под руководством старшего научного сотрудника И.В. Сафенковой.

## ПОЛУЧЕННЫЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ДАННЫЕ

*Пробоподготовка растительного материала. Приготовление экстрактов из зараженных вирусами листьев картофеля*

Для получения массового количества пробирочных растений картофеля, содержащих PVX и PVY, регулярно проводили микроклональное размножение через каждые 14-20 дней (табл. 1). Микроклонально-культивированные пробирочные растения картофеля периодически черенковали и пересаживали в пробирки со свежей питательной средой Мурашиге и Скуга (рис. 1).

**Таблица 1.** Микроклональное культивирование пробирочных растений картофеля, зараженных вирусами PVX и PVY

Вирусы	Микроклональное размножение пробирочных растений картофеля					Всего
	1 пассаж	2 пассаж	3 пассаж	4 пассаж	5 пассаж	
PVX	25	77	108	227	408	845
PVY	16	53	99	191	338	697

Как видно из таблицы 1, в результате микроклонального размножения были получены вирусные пробирочные растения в количестве 845 и 697 к вирусам PVX и PVY, соответственно.



PVY



PVX

**Рис. 1.** Культивирование пробирочных растений, зараженных вирусами PVX и PVY

Микроклонально размноженные образцы пробирочных растений вирусов картофеля были тестированы на наличие вирусных инфекций – PVX, PVY, PVM, PLRV, PVS с помощью коммерческого набора иммуноферментного анализа (табл. 2).

**Таблица 2.** Определение вирусной инфекции методом ИФА в пробирочных растениях

Вирусы	Количество образцов пробирочных растений	Количество позитивных образцов				
		PVX	PVY	PVM	PLRV	PVS
PVX	27	17	-	-	-	-
	77	27	-	-	-	-
	108	62	-	-	-	-
	277	101	-	-	-	-
	408	138	-	-	-	-
PVY	16	-	16	-	-	-
	53	-	19	-	-	-
	99	-	35	-	-	-
	191	-	59	-	-	-
	338	-	84	-	-	-

Примечание: (+) – вирус обнаружен; (-) – вирус отсутствует

Как видно из таблицы 2, в результате иммуноферментного анализа все исследуемые образцы пробирочных растений содержали PVX или PVY, которые в дальнейшем черенковали в стерильных условиях. Все проанализированные образцы были свободны от остальных вирусных инфекции – PVM, PLRV, PVS.

Протестированные микроклонально размноженные образцы, содержащие картофельные вирусы PVX и PVY, в дальнейшем высаживали в грунт для получения зеленой массы (рис. 2).



PVY



PVX

**Рис. 2.** Культивирование грунтовых растений, зараженных вирусами PVX и PVY

*Выделение и очистка вирусных препаратов*

Через две-три недели выращивания в теплице растения проверяли на присутствие вирусов картофеля методом ИФА. При наличии положительной реакции на специфический вирус – PVX или PVY – и отсутствии возможных примесей других вирусов, листья использовали для выделения и очистки вируса.

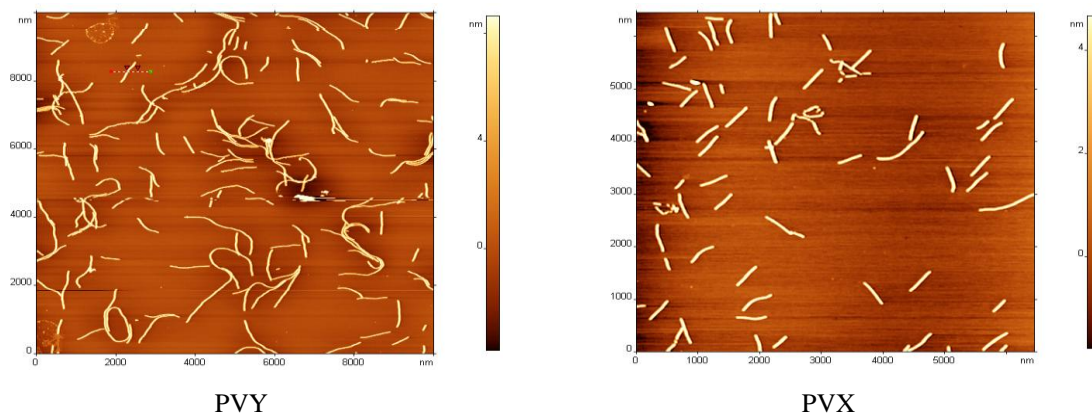
Листья растений, инфицированных PVX и PVY, гомогенизировали в течение 2 мин с охлажденным 0,05 М фосфатным буфером pH 9,0, содержащим 0,005 М ЭДТА и 0,2% 2-меркаптоэтанола в соотношении 2 мл буфера на 1 г листьев. Экстракцию проводили в течение 1-2 ч и фильтровали через два слоя марли. Оставшийся в соке клеточный детрит удаляли центрифугированием при 5000 об/мин в течение 20 мин при 4°C в роторе JA-14 центрифуги J2-21 (Beckman, США). Полученный экстракт осветляли добавлением n-бутанола (до 8,5%) и инкубировали в течение ночи при 4°C. После повторного центрифугирования вирусы осаждали из супернатанта добавлением ПЭГ-6000 до конечной концентрации 2,5% и NaCl до 0,1М. Смесь выдерживали 2 ч в холодильнике и центрифугировали в течение 20 мин при 12000 об/мин. Из осадка трижды экстрагировали вирус 0,3 М глициновым

буфером pH 7,5, осветляя каждый раз раствор низкоскоростным центрифугированием. Затем экстракт наносили на сахарозную подушку (250 мг/мл сахарозы в 0,05 М глициновом буфере pH 7,5) в объеме 15% пробирки ротора SW 28 ультрацентрифуги Beckman L8-80M и центрифугировали в течение 2,5 ч при 27000 об/мин.

Повторяли процедуру экстрагирования вируса из осадка, прошедшего через сахарозную подушку, 0,05 М глициновым буфером с последующим низкоскоростным центрифугированием. Для очистки вирусов использовали ультрацентрифугирование в ступенчатом градиенте плотности сахарозы 10-40% (w/w), приготовленное в пробирках ротора SW 41 ультрацентрифуги Beckman L8-80M. Выход высокоочищенного препарата составляет 125-250 мкг/л листьев растений. Препараты консервировали глицерином до 50% и хранили при  $-18^{\circ}\text{C}$ .

#### *Иммунохимическая характеристика вирусных препаратов*

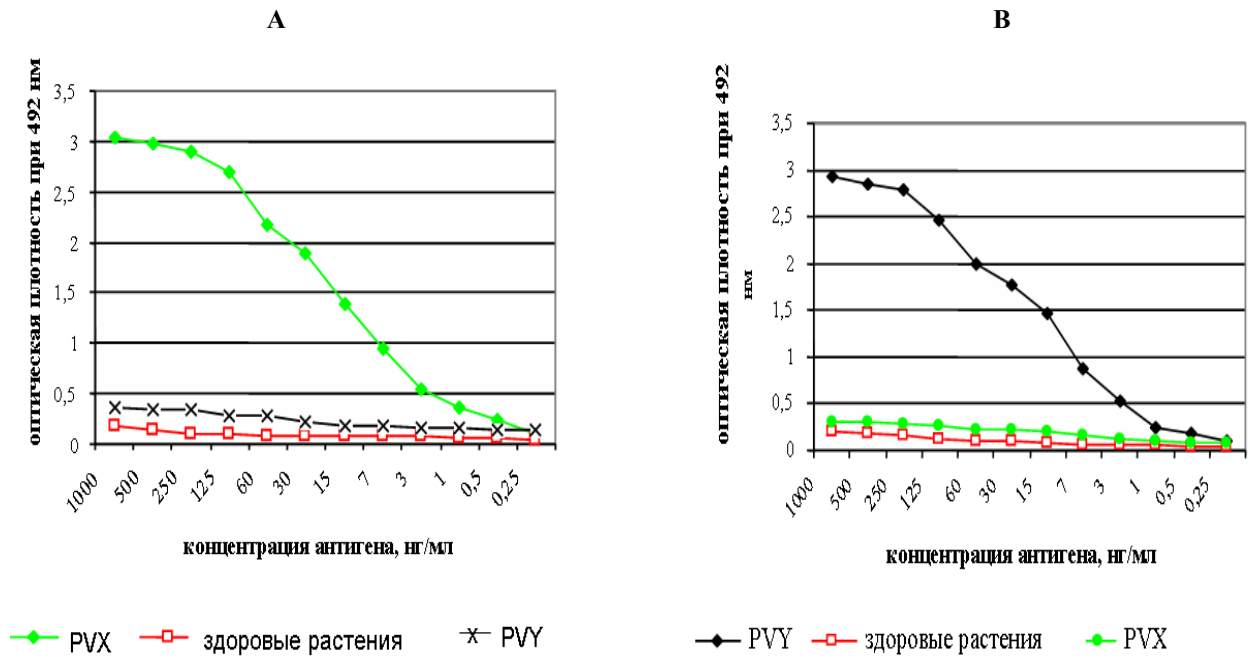
Поскольку морфология вирусных частиц, наличие агрегатов и отдельных субъединиц влияют на процесс иммунохимического взаимодействия, была проведена характеристика вирусных препаратов атомно-силовой микроскопией (рис. 3).



**Рис. 3.** Характеристика вирусных препаратов атомно-силовой микроскопией

Вирусные препараты содержали только вирусные частицы при полном отсутствии неспецифических агрегатов балластных веществ. Средняя высота вирусных частиц PVY составила  $10,5 \pm 0,7$  нм. Отдельно лежащие частицы имеют длину от 600 до 800 нм. Средняя высота (диаметр) частиц PVX достигала  $8,4 \pm 0,8$  нм. Средняя длина полноразмерных частиц вируса составила  $493 \pm 22$  нм. Данные атомно-силовой микроскопии подтвердили соответствие размерных параметров вирусов в препаратах теоретическим сведениям из базы данных International Committee Taxonomy of Viruses (2012) [12].

Антигенная активность и специфичность вирусных препаратов определялась методом ИФА с помощью кроличьих поликлональных антисывороток к PVX и PVY, конъюгированных с пероксидазой (производства Всероссийского научно-исследовательского института картофельного хозяйства им. А.Г. Лорха (г. Москва) (рис. 4). Количественные закономерности взаимодействия показывают, что чувствительность иммуноферментного определения как PVX, так и PVY, составляет 0,5-1 нг/мл. В обоих случаях низкий уровень сигнала в отрицательном контроле (здоровое растение) обеспечивало существенные различия в ОП между позитивным (вирусосодержащим) образцом и негативным контролем даже при минимальной концентрации вируса (10 нг/мл) в 1,5-2 раза. Определена достоверная специфичность связывания испытуемых вирусных препаратов с поликлональными антисыворотками. Так, при максимальной величине ОП в исходных образцах PVX и PVY (с концентрацией 1 мкг/мл) – 3,031 и 2,987 соответственно – уровень их неспецифического взаимодействия в аналогичной концентрации оказался минимальным – ОП 0,397 (связывание PVX с поликлональной антисывороткой к PVY) и ОП 0,402 (связывание PVY с поликлональной антисывороткой к PVX).



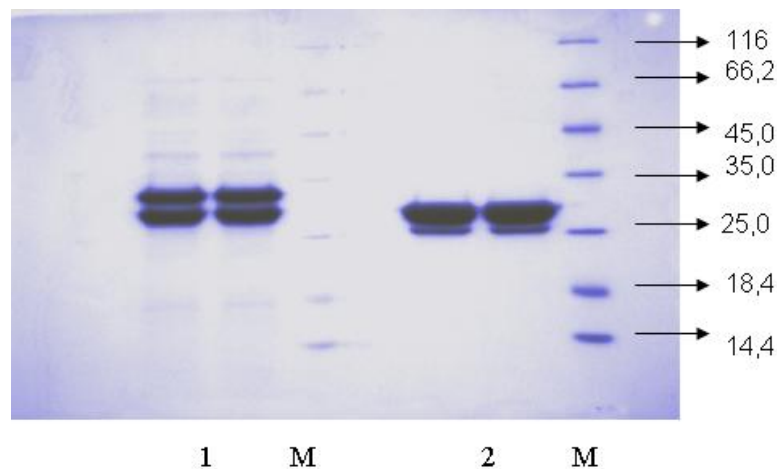
А – кроличья позитивная антисыворотка к PVX; В – кроличья позитивная антисыворотка к PVY

**Рис. 4.** Антигенная активность и специфичность вирусных препаратов в ИФА

Помимо визуализации вирусных частиц методом атомно-силовой микроскопии, их состав был идентифицирован методом электрофореза в 12% полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS-PAGE) (рис. 5).

Анализ белка нативного препарата PVX электрофорезом в ПААГ в присутствии SDS показал наличие двух белковых полос. Молекулярная масса белка оболочки PVX, исходя из первичной структуры гена, составляет 25 кДа. Известно, что белок оболочки PVX при проведении электрофореза в ПААГ в денатурирующих условиях ведет себя anomalно. Anomalное 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 [12-14].

Аналогичные результаты наблюдали при электрофоретическом разделении нативного препарата PVY. Молекулярная масса капсидного белка вируса, определённая исследователями, составляет 34 кДа. Молекулярная масса детектируемого нами белка для PVY соответствовала теоретическим данным молекулярной массы мономерного белка оболочки данного вируса. Однако белок оболочки PVY в ПААГ в присутствии SDS также мигрировал двумя полосами, что обусловлено присутствием изомеров белка. В испытуемых вирусных препаратах не содержались детектируемые количества белков растения-хозяина [12, 15, 16].

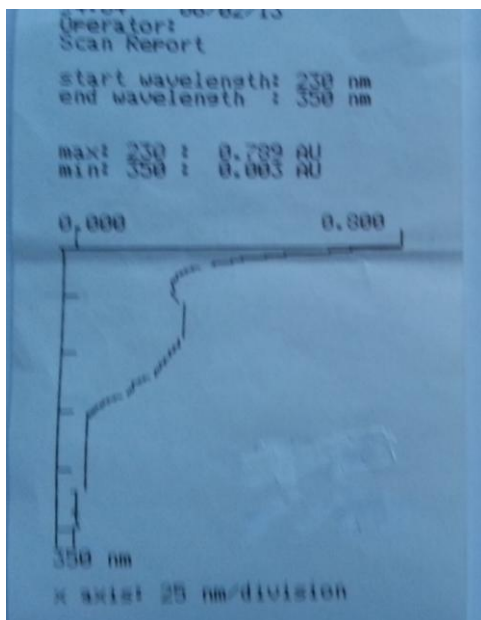


1 – PVY; 2 – PVX

**Рис. 5.** Электрофоретическое разделение вирусных препаратов



Сравнение спектральных характеристик вирусных препаратов позволяет измерить его концентрацию и получить информацию о степени чистоты препарата. Важной характеристикой вирусных препаратов является величина соотношения поглощения при 260 и 280 нм. Как видно из рисунков, вирусные препараты имеют типичные нуклеопротеидные спектры. Соотношение  $A_{260}/A_{280}$  соответствует теоретическому для высокоочищенных препаратов – 1,20 для PVX и 1,28 для PVY. Коэффициенты молярной экстинкции равны 2,7 для PVX и 3,0 для PVY (светопоглощение при  $A_{260}$  вируса в концентрации 1 мг/мл) [12].



PVX



PVY

Рис. 6. Нуклеопротеидные спектры поглощения вирусных препаратов

Таким образом, вирусные препараты PVX и PVY характеризовались типичными для поти- и потексвирусов размерными характеристиками, спектрами поглощения ( $A_{260}/A_{280}$  – 1,20 для PVX и 1,28 для PVY), чистой электрофоретической разделением и специфической активностью в ИФА.

## ВЫВОДЫ

1. Методом микроклонального размножения пробирочных растений и высадки в грунт наработана биомасса экспериментального растительного материала, инфицированных PVX и PVY.
2. Определена эффективность метода выделения вирусного препарата на основе ультрацентрифугирования на сахарозной подушке с последующей очисткой в ступенчатом градиенте плотности сахарозы (10-40%). Выход препаратов составил 10-50 мкг/л.
3. Вирусные препараты PVX и PVY характеризовались типичными для поти- и потексвирусов размерными характеристиками, спектрами поглощения ( $A_{260}/A_{280}$  – 1,20 для PVX и 1,28 для PVY), чистой электрофоретической разделением и специфической активностью в ИФА.

## 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. ISBN: 0792367294.
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. 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.
4. Бобкова А.Ф., Блинов А.Н., Чирков С.Н. *Пиротест - метод иммуноферментного анализа вирусов картофеля* // *Аграрная Россия*. – 2003. – №3. – С. 23-27.
5. Дрыгин Ю.Ф., Чирков С.Н., Блинов А.Н., Гаврюшина Е.С., Жержев А.В., Бызова Н.А., Дзантиев Б.Б., Атабеков И.Г. *Высокочувствительные технологии молекулярной диагностики вирусных и вирусной инфекции*

картофеля // *Картофелеводство России: актуальные проблемы науки и практики: матер. междунар. конгресса «Картофель. Россия – 2007»*. – М.: ФНГУ «Росинформагротех», 2007. – С. 17-25.

6. Блинов А.Н., Дрыгин Ю.Ф., Григоренко В.Г., Андреева И.П., Осипов А.П., Атабеков И.Г. Инновационная технология экспресс-диагностики вирусных инфекций растений методом иммунохроматографии на тест-полосках // *Картофелеводство: результаты исследований, инновации, практический опыт: матер. науч.-практ. конф. и координац. совещания «Научное обеспечение и инновационное развитие картофелеводства»*. – М., 2008. - Т. 1. – С. 290-297.

7. Бызова А.Н., Сафенкова И.В., Чирков С.Н., Жердев А.В., Блинов А.Н., Дзантиев Б.Б., Атабеков И.Г. Разработка иммунохроматографических тест-систем для экспрессной детекции вирусов растений // *Прикладная биохимия и микробиология*. – 2009. – №2. – С. 225-231.

8. Drygin Yu.F., Blintsov A.N., Varitzev Yu.A., Uskov A.I., Kravchenko D.V., Atabekov I.G. Highly sensitive field test lateral flow immunodiagnosics of PVX infection // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2012. – Vol. 93. - P. 179-189.

9. Усков А.И., Анисимов Б.В., Варицев Ю.А., Кравченко Д.В., Овэс Е.В., Дрыгин Ю.Ф., Блинов А.Н., Осипов А.П., Григоренко В.Г., Андреева И.П., Атабеков И.Г. Новый метод экспресс-диагностики вирусов картофеля на иммунохроматографических тест-полосках / *Россельхозакадемия, ВНИИКХ*. – М., 2010. – 13 с.

10. Мэтьюс Р. Вирусы растений. – М.: Мир, 1973. – 520 с.

11. Мэйхи Б. Вирусология. Методы. – М.: Мир, 1988. – 389 с.

12. *Virus Taxonomy: Report of the International committee on Taxonomy of Viruses // International Union of Microbiological Societies. Virology Division / ed. by A. King., M. Adams. - 2012.*

13. *Практикум по общей вирусологии / под ред. И.Г. Атабекова. – М.: МГУ, 2002. – 184 с. ISBN: 5-211-04529-7.*

14. Hossain M., Bajet N.B. Isolation, Purification and patrial characterization of potato X potexvirus (PVX) the Philippines // *Journal of tropical plant pathology*. – 2001. – Vol. 37 (1). – P.16-27.

15. Watts N, Sing R.P. Discrimination Between Common and Necrotic Strains of Potato Virus Y by Denaturing Isoelectric Focusing // *Phytopathology*. – 1994. – Vol. 84. - P. 991-994.

16. Jamal S., Sabir M.. Identification of six potato virus Y isolates from Saudi Arabia // *African Journal of Biotechnology*. – 2012. - 22 May. – Vol. 11(41). - P. 9709-9715.

## ТҮЙІН

Вирустық аурулардың заманауи диагностикасы аурудан аса материал отырғызудың (егілетін) өндірістік шешуші буыны болып саналады. Оның ең кең қолданылуы карантиндік шектеу мақсатында және отырғызылатын материалды сертификаттау үшін фитосанитарлық мониторингтік шектеу мен фитосанитарлық селекция болып саналады. Бұдан басқа, диагностикалау вирустық инфекцияға төзімді жаңа сорттарға қол жеткізу үшін гендік инженериялық және селекциялық қамтамасыз етумен картопты вирустан сауықтыруда бақылау ретінде де аса қажетті.

Иммундық талдау жүйесінің осы заманғы негізгі даму бағыты құрал-саймансыз әдіс. Құрал-сайманды зерттеу әдістері – ИФТ және ПТР жоғары дәлдікті болғанымен, көп жұмысты, күрделі, көп уақытты, білікті мамандарды және жоғары деңгейде жабдықталған зертханалармен орталықтарды қажет етеді.

Анағұрлым кең таралған патогенді картоптың PVY және PVX вирустарын тізгіндеуде иммунохроматографиялық тест жүйесін жетілдіру үшін экспрессиялық детекциялауда жоғары тазалықта вирустық препараттарды бөліп алумен байланысты, телімді моно-поли-клоналды антиденелерге қол жеткізу және тест жолақтарын құрастырудың оптималды параметрлерін тұрақтардыру сынды барлық методологиялық әдістер шешуді талап етеді.

Зерттеу нәтижесінде картоп вирустарымен залалданған түтікшеде микроклоналды әдіспен көбейтілген және топыраққа отырғызылған тәжірибелік өсімдік материалының биомассасы алынды. Сахарозаның градиентті тығыздығында ультрацентрифукалау арқылы тазаланып алынған вирустық препаратты тазалау методінің тиімділігі анықталды. Вирустық препараттар поти- және потексвирустарының спектрлік аймағына (PVX үшін  $A_{260}/A_{280}$ – 1,20 және PVY үшін 1,28), сэндвич – ИФА телімді белсенділік пен электрофоретикалық бөліну тазалығына тән сипатталынды.

**Кілттік сөздер:** картоп вирусы, картоп, детекция, микроклоналды көбейту.

## SUMMARY

Opportune diagnosis of viral diseases is a key element in the production of healthy planting material. In the grand scale of its use for pest monitoring and Plant Breeding, for certification of planting material and for quarantine purposes. Furthermore, the diagnosis is needed to control the recovery of the potato-virus and plant breeding and genetic engineering work to develop new varieties that are resistant to viral infection.

The main trends of development of immunoassay systems - a transition to non-instrumental methods. Although instrumental methods of analysis - the ELISA and PCR are characterized by a high degree of accuracy, they are time-consuming, complicated, time consuming, require highly skilled personnel and expensive equipment, which limits their application range of well-equipped laboratories and centers.

Given the need to control the most common pathogen of potato - PVY and PVX viruses to develop immunoassays test systems for express detection requires a decision by a number of instructional techniques associated with the release of the highly purified virus derived mono-specific polyclonal antibodies and optimization of design parameters of test strips.

The result of research method of micropropagation test-tube plants and Bedding experience accumulated biomass pilot plant material infected with potato viruses. The efficiency of the method of isolating the virus preparation through

ultracentrifugation on a sucrose cushion with subsequent purification by sucrose density gradient. Viral preparations were characterized by typical Poti and poteksvirusov size characteristics, the absorption spectra ( $A_{260}/A_{280}$ - 1,20 to 1,28 for PVX and PVY), electrophoretic separation purity and specific activity in ELISA.

**Keywords:** potato virus, potatoes, detection, micropropagation.