



УДК 578.85/86.083.3

© 1991 г.

Т. Н. Плечко, А. В. Кириллов, С. М. Амбросова,  
О. В. Борисова\*, А. Г. Одиноц\*

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ В ДИАГНОСТИКЕ ФИТОВИРУСОВ

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР, Москва;  
\* Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, кафедра вирусологии биологического факультета

Получен набор моноклональных антител (МА) к вирусу мозаики резухи (*Arabis mosaic virus*), поражающему ряд плодовых и овощных культур, а также некоторые цветы. МА относятся к классам IgG и IgM. Антитела выделяли из культуральной и асцитной жидкостей осаждением сульфатом аммония или полиэтиленгликолем. Далее, в зависимости от класса антител и необходимой степени чистоты, проводили ионообменную хроматографию на DEAE Toyopearl TSK-Gel с последующей хроматографией на белок-А-сефарозе. Определен подкласс МА и их  $K_{sv}$  с антигеном. Проведено сравнение поли- и моноклональных антител при использовании различных схем иммуноферментного анализа (ИФА). «Сэндвич»-вариант ИФА с МА класса IgG позволяет определить 2—3 нг/мл ВМР в очищенном препарате вируса. Кроме того, МА могут быть использованы для определения ВМР в соке зараженного растения. Опробован и признан перспективным метод диагностики ВМР с помощью латекс-агглютинации.

Вирусы растений широко распространены и наносят значительный ущерб сельскому хозяйству. Особенно это касается растений, размножающихся вегетативным путем (клубнями, черенками, луковицами). Поскольку вирусная инфекция внешне может проявляться слабо, возникает необходимость выявления зараженных растений. Успехи, достигнутые в сельском хозяйстве ряда европейских стран, объясняются, в частности, хорошей постановкой иммунодиагностики вирусов [1, 2]. Для идентификации вирусов используется ряд иммунохимических тестов: иммунодиффузия, реакция агглютинации, радиоиммунный и иммуноферментный анализы и др.

В настоящее время наиболее перспективным, удобным и высокочувствительным методом диагностики является ИФА. Его чувствительность на 2—3 порядка выше, чем у серологических методов, и сравнима с чувствительностью РИА. Для ИФА требуется небольшое количество растительного материала (несколько миллиграммов), что очень важно в селекционной работе [3]. Для проведения ИФА необходимы высококачественные антисыворотки. При использовании в этих целях поликлональных антител возникают проблемы, связанные с изменениями количества, качества и специфичности антител у разных животных и даже в различных порциях крови одного животного. Эти проблемы разрешимы при замене поликлональных антител моноклональными, которые можно получать практически в неограниченном количестве без дополнительных затрат вирусных препаратов [4]. При использовании МА в диагностических целях необходимо определить конкретные условия проведения ИФА, поскольку антитела могут по-разному взаимодействовать с антигеном в различных модификациях метода ИФА [5].

Принятые сокращения: МА — моноклональные антитела, ВМР — вирус мозаики резухи, ИФА — иммуноферментный анализ, РИА — радиоиммунный анализ, EDTA — этилендиаминтетрауксусная кислота, БСА — бычий сывороточный альбумин, PBS — фосфатно-солевой буфер.

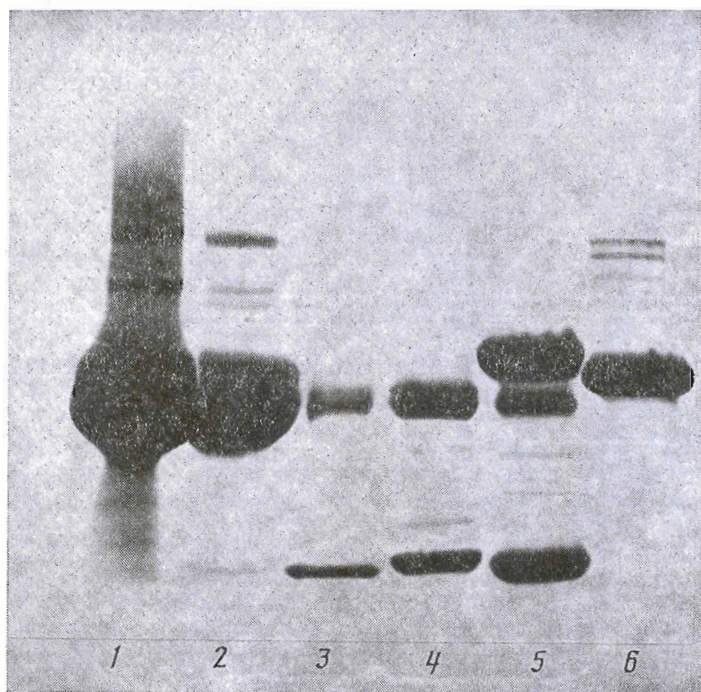


Рис. 1. Электрофорез образцов, денатурированных в додецилсульфате натрия, в градиенте ПААГ. 1 — МА 4А2 после 2-кратной преципитации 50%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 2 — МА 4А2 после ионообменной хроматографии на геле DEAE-Toyopearl TSK, 3 — МА 4А2 после хроматографии на белок-А-сефарозе, 4 — МА 3В4 после хроматографии на белок-А-сефарозе, 5 — МА 1А10 после 2-кратной преципитации из асцита полиэтиленгликолем, 6 — БСА

Целью настоящей работы было получение МА к вирусу мозаики резухи и разработка на их основе методических аспектов использования МА для диагностики фитовирусов.

ВМР (*Arabis mosaic virus*) поражает широкий спектр плодовых и ягодных культур (малину, ежевику, смородину, землянику), некоторые овощные культуры и цветы. Так как накопление и выделение вируса — длительный и трудоемкий процесс и антиген доступен в ограниченных количествах, мы первоначально использовали метод однократной иммунизации мышей [6], где 20—30 мкг антигена без адъюванта вводят непосредственно в селезенку животного, находящегося под наркозом, за 3 сут до гибридизации. В результате происходит стимуляция В-лимфоцитов селезенки. Как показали эксперименты, при таком способе иммунизации все полученные антитела принадлежат к классу IgM. Видимо, за время между иммунизацией и слиянием клеток развивается только первичный иммунный ответ. К таким же выводам пришли авторы обзора [7], где обсуждались разные схемы иммунизации. Авторы предлагают после первой иммунизации в селезенку делать интервал в 3 мес перед последней иммунизацией, чтобы повысить вероятность получения МА класса IgG. Из пяти полученных нами клонов, продуцирующих антитела класса IgM, мы отобрали два, дающих наибольший титр антител в культуральной жидкости, — 1А10 и 3Г3. Их выделяли из асцитной жидкости 2-кратным осаждением полиэтиленгликолем с  $M_r$  6000 [8]. По данным электрофореза в полиакриламидном геле, полученный препарат антител 1А10 был достаточно чистым. Единственными примесными белками были нормальные иммуноглобулины мыши класса IgG (рис. 1, 5). Использование МА класса IgM в ИФА показало, что уровень неспецифического связывания в этом случае составляет 0,2—0,4 ОЕ и чувствительность метода не превышает 30—60 нг ВМР на 1 мл (рис. 2). Некоторые препараты поликлональных антител дают более высокий уровень чувствительности [3]. Для проведения ИФА с соком растений антитела класса IgM непригодны,

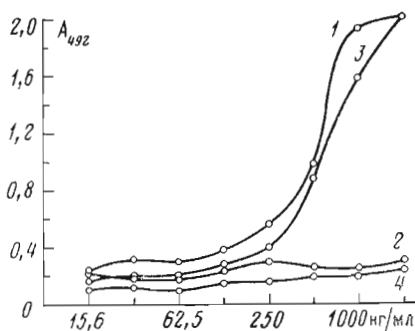


Рис. 2

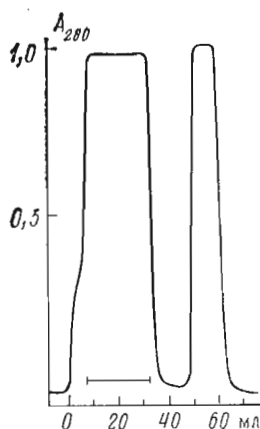


Рис. 3

Рис. 2. Результаты «сэндвич»-ИФА очищенного препарата ВМР с использованием МА 1А10 (IgM). Субстраты — *о*-фенилендиамин (1, 2) и аминокантипирин (3, 4), контроль — вирус мозаики люцерны (2, 4)

Рис. 3. Хроматография МА 3В4 на колонке (1,6 × 10 см) с DEAE-Toyopearl 650M. Отмечена отбираемая фракция. Условия элюции см. в «Экспер. части»

так как они неспецифически связывались с соком здоровых растений в контрольных пробах. Использование в качестве субстрата 4-аминоантипирин вместо обычно применяемого *орто*-фенилендиамина не привело к повышению чувствительности метода (рис. 2). Таким образом, был сделан вывод о непригодности МА класса IgM для целей диагностики ВМР.

Для получения МА класса IgG мы использовали стандартную схему 2—4-кратной внутрибрюшинной иммунизации антигеном в адьюванте Фрейнда с интервалом между инъекциями 2 или 4 нед. После второй или третьей иммунизации отбирали кровь из хвостовой вены для определения титра сыворотки. Обычно титр составлял  $1 : 3 \cdot 10^4$ — $1 : 1 \cdot 10^5$ . Для гибридизаций использовали миеломную линию Р3Х63.Аg8.653. Гибридизации проводили по обычной методике [9] с использованием полиэтиленгликоля с мол. массой 1500. Клоны-продуценты МА выявляли методом «сэндвич»-ИФА, при котором на плашку сорбировались поликлональные антитела кролика к ВМР, а связавшиеся с антигеном МА определяли с помощью антимышинных антител козла, конъюгированных с пероксидазой хрена. Для контроля специфичности антител их проверяли на взаимодействие с вирусом огуречной или табачной мозаики. Таким образом, мы отбирали только те МА, которые специфически взаимодействуют с антигеном в «сэндвич»-ИФА. Известно, что часто МА, отобранные с помощью метода непрямого ИФА (вирус сорбируется непосредственно на планшет), не взаимодействуют с антигеном в «сэндвич»-ИФА [4]. Возможно, это связано с тем, что при сорбции вируса на планшетах меняется «нативная» антигенная детерминанта и идет отбор МА, которые потом не взаимодействуют с вирусом в соке растения.

После двух гибридизаций были получены две линии гибридом, продуцирующих МА IgG класса: 3В4 и 4А2. МА выделяли из культуральной жидкости по следующей схеме:

- 1) 2-кратное осаждение 50% раствором сульфата аммония;
- 2) ионообменная хроматография на Toyopearl TSK-геле (Tojo-Soda, Япония);

- 3) аффинная хроматография на белок-А-сефарозе. При очистке на Toyopearl TSK-геле МА выходят в первом пике (рис. 3), который содержит большие количества сывороточного альбумина и других белков сыворотки телят, однако они могут быть использованы для проведения ИФА. После этапа 3 МА были очищены до гомогенного состояния (рис. 1, 3, 4). Выход чистых МА составлял 5—7 мкг на 1 мл культуральной жид-

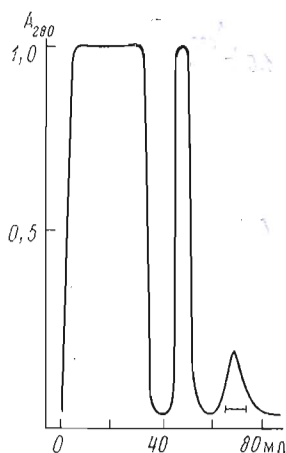


Рис. 4. Профиль элюции МА 3В4 (после ионообменной хроматографии на Тоуореарл) на белок-А-сефарозе. Отмечена отбираемая фракция. Условия см. в «Экспер. часть»

Рис. 5. Результаты «сэндвич»-ИФА очищенного препарата ВМР (1). Первые антитела — поликлональные кроличьи, вторые — 3В4. 2 — контроль с вирусом мозаики ксеноподиума

Рис. 6. Результаты «сэндвич»-ИФА для очищенного препарата ВМР. Первые антитела — 3В4 (1) или 4А2 (3). Конъюгат 3В4 с пероксидазой хрена. 2 и 4 — контроль с вирусом огуречной мозаики

2

Рис. 4

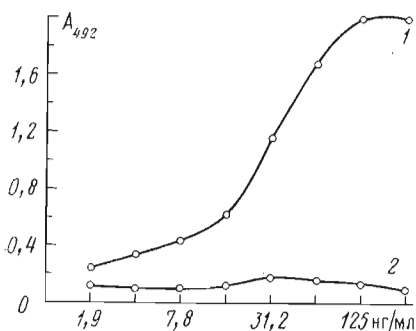


Рис. 5

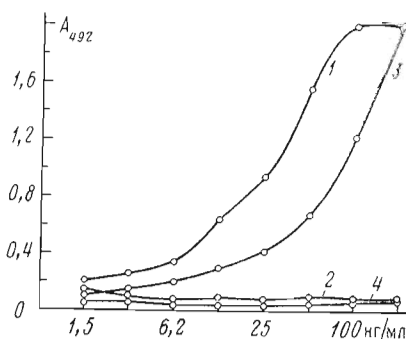


Рис. 6

кости. Высокоочищенный препарат МА нужен для количественного определения вируса и измерения константы связывания  $K_{св}$ .

Оба МА принадлежали к подклассу IgG2b. Подкласс определяли иммунопреципитацией в 1% агарозе с антителами козла против подклассов иммуноглобулинов мыши. О принадлежности МА к подклассу IgG2b говорил и тот факт, что при элюции с белок-А-сефарозы в градиенте pH антитела начинали выходить с колонки при pH буфера 3,0—3,5, что соответствует подклассу IgG2b [10] (рис. 4).

Использование МА класса IgG в «сэндвич»-ИФА позволило определять до 2—3 нг ВМР в 1 мл очищенного препарата. Неспецифическое связывание не превышало 0,05—0,10  $OE_{492}$ . Мы провели сравнение различных вариантов «сэндвич»-ИФА. Из таблицы видно, что хорошие результаты получаются как при использовании в качестве «первых» антител поликлональных антител кролика, так и в «моноклональном» варианте ИФА. Чувствительность в обоих случаях примерно одинакова:

Сравнительные результаты «сэндвич»-ИФА с использованием поли- и моноклональных антител

| Нижние антитела                            | Верхние антитела | Конъюгат                                                   | Чувствительность, нг/мл |
|--------------------------------------------|------------------|------------------------------------------------------------|-------------------------|
| Поликлональные антитела кролика против ВМР | 3В4 (IgG2b)      | Поликлональные антитела козла против иммуноглобулинов мыши | 2—3                     |
| То же                                      | 4А2 (IgG2b)      | То же                                                      | 6—8                     |
| 3В4                                        | —                | 3В4-ПХ *                                                   | 2—3                     |
| 4А2                                        | —                | 3В4-ПХ                                                     | 4—6                     |
| 1А10 ((IgM)                                | —                | 1А10-ПХ                                                    | 30—60                   |

\* ПХ — пероксидаза хрена.

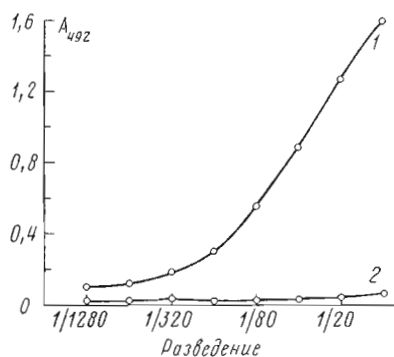


Рис. 7

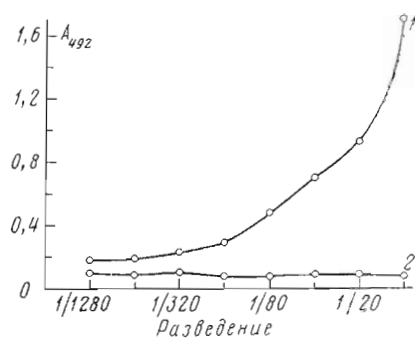


Рис. 8

Рис. 7. Результаты «сэндвич»-ИФА с соком растения, зараженного ВМР (1). Первые антитела — поликлональные кроличьи против ВМР, вторые — антитела 3В4. 2 — контроль с соком здорового растения

Рис. 8. Результаты «сэндвич»-ИФА с соком растения, зараженного ВМР (1). Первые антитела 3В4. 2 — контроль с соком здорового растения

2—3 нг/мл (рис. 5, 6). В реакции определения ВМР в соке зараженных растений результаты также примерно одинаковы (рис. 7, 8). Мы остановили выбор на моноклональном варианте ИФА, так как для него не требуются поликлональные антитела из сыворотки животных.  $K_{св}$  для антител класса IgG были определены методом неконкурентного ИФА [11].  $K_{св}$  для МА типа 3В4 равнялась  $3,5 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$ , для антител типа 4А2 —  $2,0 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$ .

Мы также исследовали возможность использования для диагностики фитовирусов реакции латексной агглютинации\*, которая представляет собой чрезвычайно простой одностадийный метод диагностики фитовирусов как в виде очищенных препаратов, так и в соке растений. Метод прост, не требует сложных приборов и дорогих реактивов, результаты анализа можно определять визуально. Чувствительность метода в лучших случаях составляла 2—4 нг ВМР на 1 мл, т. е. была сравнима с чувствительностью ИФА.

Таким образом, нами были получены МА к ВМР и разработана методика проведения ИФА, позволяющая определять наличие вируса в соке и тканях растений в концентрации до 2—3 нг/мл. Антитела прошли успешные испытания в Ботаническом саду АН СССР и на кафедре вирусологии МГУ им. М. В. Ломоносова. На их основе планируется выпуск диагностического набора.

### Экспериментальная часть

**Накопление и выделение ВМР.** Изолят ВМР был любезно предоставлен доктором Кляйхемпелем (ГДР). Вирус накапливали на растениях *Chenopodium quinoa* и выделяли по методу Дэвиса и Кларка [12]. Листья срезали через 4 нед после заражения, гомогенизировали в 0,2 М Na-ацетатном буфере (pH 6,0), содержащем 0,01 М EDTA (2 л на 1 кг листьев). Экстракт отжимали через марлю и 1 М уксусной кислотой доводили pH до 4,7. Осадок удаляли центрифугированием в течение 15 мин при 10 000 об/мин, 1 М NaOH доводили pH супернатанта до 6,0, вирус осаждали добавлением 6% полиэтиленгликоля с мол. массой 6000. После инкубации в течение ночи при 4°C осадок отделяли низкоскоростным центрифугированием (Beckman T2-21, США) и растворяли в 0,05 М Na-фосфатном буфере, pH 7,0. Нерастворившуюся часть осадка отбрасывали, а супернатант центрифугировали 90 мин при

\* Латексные частицы диаметром 1,7 мкм, полученные полимеризацией акролеина в водно-щелочной среде и окрашенные в розовый цвет, были любезно предоставлены научным сотрудником лаборатории «Полимеры для биологии» ИВХ АН СССР Ю. В. Лукиным.

145 000 g. Осадок ресуспендировали в 0,05 М Na-фосфатном буфере, pH 7,0, осветляли низкоскоростным центрифугированием и ультрацентрифугирование (Hitachi SCP85 H, Япония) повторяли еще раз. Осветленный после растворения вирусный препарат центрифугировали 150 мин при 82 000g в градиенте концентрации сахарозы 10—40 %, приготовленной на 0,05 М Na-фосфатном буфере, pH 7,0. Очищенный вирус осаждали ультрацентрифугированием, растворяли в Na-фосфатном буфере, pH 7,0, и хранили в 50 % глицерине при  $-20^{\circ}\text{C}$ .

*Внутрибрюшинная иммунизация.* 30—100 мкг вируса в фосфатно-солевом буфере (PBS) \*, pH 7,2, смешивали с равным объемом адьюванта Фрейнда и встряхивали 30—40 мин до образования гомогенной суспензии. Первую иммунизацию проводили в полном адьюванте Фрейнда, последующие — в неполном. За 4 сут до гибридизации животным вводили 30—50 мкг антигена без адьюванта.

Внутриселезеночную иммунизацию проводили по методу Spitz и др. [6].

*Проведение гибридизации.* Для слияния клеток использовали полиэтиленгликоль с мол. массой 1500 (Merck). К 2,25 г полиэтиленгликоля добавляли 2,7 мл PBS, нагревали до  $60^{\circ}\text{C}$  и фильтровали через мембранный фильтр с размером пор 0,2 мкм (Flow).

Гибридизацию проводили по стандартной методике [9]. Из мышей на 4-е сут после последней иммунизации стерильно извлекали селезенку и готовили суспензию спленоцитов. Общее количество клеток и их жизнеспособность определяли с помощью камеры Горяева.  $5 \cdot 10^7$ — $10^8$  выделенных клеток осаждали центрифугированием при 1000 g в течение 5 мин. Затем  $1/2$  спленоцитов смешивали с клетками миеломной линии P3  $\times$  63-Ag8.653 в соотношении 1 : 1, а вторую половину суспензии спленоцитов замораживали в эмбриональной сыворотке телянка с 15 % диметилсульфоксида и хранили при  $-85^{\circ}\text{C}$  до года для использования в последующих гибридизациях. Смесь клеток осаждали центрифугированием в безсывороточной среде RPMI-1640, к осадку клеток добавляли 1 мл нагретого до  $37^{\circ}\text{C}$  полиэтиленгликоля и инкубировали 1 мин. Затем медленно, по каплям (10 мл за 5 мин) добавляли среду RPMI-1640 (Gibco, США) без сыворотки и еще 20 мл среды в течение 2 мин. Клетки центрифугировали при 900 g в течение 3 мин и осторожно суспендировали в среде RPMI-1640, содержащей  $10^{-4}$  М гипоксантин,  $4 \cdot 10^{-7}$  М аминоптерин и  $1,6 \cdot 10^{-5}$  М тимидин, и равномерно распределяли по четырем 48-луночным или шести 96-луночным планшетах, на которые была накануне нанесена суспензия перитонеальных макрофагов мыши ( $5 \cdot 10^5$ — $10^6$  клеток). Планшеты инкубировали 7—10 сут до появления гибридных клонов, после чего дважды через день меняли 50 % среды в каждой лунке на свежую и проводили тестирование на синтез специфических антител.

*Клонирование гибридом* проводили методом лимитирующего разведения. Суспензии гибридных клеток готовили в концентрациях 50 000, 500 и 50 клеток в 15 мл среды RPMI-1640, содержащей  $10^{-4}$  М гипоксантин и  $1,6 \cdot 10^{-5}$  М тимидин, и помещали в 96-луночные планшеты, в которые накануне была внесена суспензия перитонеальных макрофагов мыши ( $5 \cdot 10^5$ — $10^6$  клеток на четыре планшета). После появления колоний (10—14 дней) культуральную жидкость тестировали на присутствие специфических МА.

*Наработка препаративных количеств МА.* Для получения асцитов мышам линии BALB/c (возраст 4—6 нед) делали инъекцию 0,5 мл pristana (2,6,10,14-тетраметилпентадекан, Koch-Light Laboratories, Великобритания) внутрибрюшинно за 7—10 сут до введения клеток. Клетки отмывали один раз в среде RPMI-1640 без сыворотки и вводили внутрибрюшинно в количестве  $5 \cdot 10^6$ — $10^7$  на мышь. Через 14—16 сут мышей с выраженным ростом асцита забивали и собирали асцитную жидкость. Для освобождения от клеток асцитную жидкость центрифугировали 5 мин при 1000g, замораживали и хранили при  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Для выделения МА из культуральной жидкости гибридомные клетки

\* 0,02 М фосфатный буфер, содержащий 0,15 М NaCl, pH 7,2—7,4.

выращивали в колбах. Клетки, находящиеся в логарифмической фазе роста, собирали, подсчитывали процент жизнеспособных клеток (не ниже 90%) и засеивали в колбы на 250 мл; посевная концентрация  $4 \cdot 10^5$  клеток/мл, объем заполнения 70 мл. Колбы инкубировали 3—4 сут при 37° С и 160 об/мин в шейкере-инкубаторе New Brunswick Scientific. Затем суспензию собирали в пробирки и центрифугировали 5 мин при 1000 g для отделения клеток от культуральной жидкости.

*Определение специфических МА в культуральной жидкости методом «сандвич»-ИФА* проводили по следующей схеме:

1) в 96-луночные планшеты для ИФА вносили по 50 мкл кроличьих поликлональных антител против ВМР (5 мкг/мл) в 0,02 М карбонатном буфере, pH 9,6, и инкубировали ночь при 4° С;

2) вносили по 50 мкл 1% БСА в PBS и инкубировали 1 ч при 20° С;

3) вносили по 50 мкл ВМР (2 мкг/мл) в PBS и инкубировали 2 ч при 37° С;

4) вносили по 50 мкл тестируемой культуральной жидкости и инкубировали 2 ч при 20° С;

5) вносили по 50 мкл конъюгата поликлональных антител кролика к иммуноглобулинам мыши с пероксидазой хрена в PBS с 0,05% Tween-20 и инкубировали 1 ч при 20° С;

6) вносили по 50 мкл *o*-фенилендиамина в 0,1 М цитратном буфере, pH 5,0, с 0,01% (по объему) 30%  $H_2O_2$ .

Развитие окраски останавливали добавлением 50 мкл 1 М  $H_2SO_4$ . Между стадиями планшеты промывали 3—5 раз PBS с 0,05% Tween-20.

Количественно результаты ИФА измеряли на спектрофотометре Tiertek Multiskan при длине волны 492 нм.

*Выделение МА из культуральной жидкости.* Культуральную жидкость центрифугировали 5 мин при 1000 g для осаждения клеток. Иммуноглобулины осаждали, добавляя в охлажденную до 4° С культуральную жидкость сухой сульфат аммония до концентрации 50% от насыщающей. pH смеси доводили до 7,4, используя 1 М NaOH, и оставляли на ночь. Осадок, отделенный центрифугированием при 10 000 g (20 мин), растворяли в PBS в объеме  $1/10$  от исходного и проводили повторное осаждение, добавляя раствор сульфата аммония, pH 7,4, до концентрации 40% от насыщающей при 4° С. После перемешивания в течение 2 ч осадок отделяли центрифугированием при 10 000g (20 мин) и растворяли в минимальном объеме стартового буфера (0,015 М фосфатный буфер, pH 6,5). Полученный раствор диализовали против четырех смен стартового буфера при 4° С и центрифугировали при 20 000g (15 мин) для удаления образовавшегося осадка. Затем хроматографировали на колонке ( $1,6 \times 10$  см) с анионообменником DEAE-Toyorearl 650 M (Toyo-Soda, Япония) уравновешенным стартовым буфером. Скорость элюции 15 мл/(см<sup>2</sup>·ч). Моноклональные антитела не сорбировались на колонке и содержались во фракции несвязавшихся белков. Колонка промывалась стартовым буфером до полного выхода несвязавшихся белков, регенерировалась 0,5 М фосфатным буфером, pH 6,5, и уравнивалась стартовым буфером. При необходимости проводили дальнейшую очистку МА на белок-А-сефарозе.

*Очистка на белок-А-сефарозе.* Антитела, предназначенные для получения конъюгата с пероксидазой хрена, очищали на колонке ( $1,0 \times 6,0$  см) с белок-А-сефарозой (Pharmacia, Швеция). Скорость элюции 10 мл/(см<sup>2</sup>·ч) при 4° С. Фракцию с Toyorearl, содержащую МА, смешивали с равным объемом буфера (1,5 М глицин, 3 М NaCl, pH 8,9) и наносили на колонку. Затем колонку промывали 0,1 М цитратным буфером, pH 4,5. МА, относящиеся к подклассу IgG2b, оставались сорбированными на колонке и элюировались 0,1 М цитратным буфером, pH 3,0. pH фракции очищенных МА доводили до 7,0, используя 1 М трис-HCl, pH 9,0, и антитела осаждали, добавляя сульфат аммония до концентрации 50% от насыщающей при 4° С. Осадок отделяли центрифугированием при 10 000g (20 мин) и растворяли в минимальном объеме PBS.

*Выделение МА из асцитной жидкости.* Для осаждения антител исполь-

зовали 50% раствор полиэтиленгликоля с мол. массой 6000 (Merck) в PBS. К асцитной жидкости добавляли равный объем PBS и затем медленно, по каплям, 50% раствор полиэтиленгликоля до конечной концентрации 6%. Затем осадок выдерживали на льду 15 мин и центрифугировали при 5000 об/мин. Осадок растворяли в PBS (1/2 первоначального объема) и вновь осаждали как описано выше. После центрифугирования осадок растворяли в минимальном объеме фосфатного буфера, содержащего 0,5 М NaCl для предотвращения преципитации IgM. МА хранили в 50% глицерине при  $-20^{\circ}\text{C}$ .

*Конъюгация МА с пероксидазой хрена.* Пероксидазу хрена (Boehringer—Mannheim Grad I, RZ\* 3,0) растворяли в 0,1 М ацетатном буфере, pH 4,8, до концентрации 8 мг/мл и активировали 20 мин 20 мМ NaIO<sub>4</sub> при  $20^{\circ}\text{C}$ , после чего проводили диализ против 5 мМ ацетатного буфера, pH 4,8. Очищенные МА (1,5—3,0 мг/мл) диализовали против 0,1 М карбонатного буфера, pH 9,6. При конъюгировании молярное соотношение пероксидазы хрена и антител составило 1,5 : 1,0. Реакцию конъюгации проводили при  $4^{\circ}\text{C}$  в течение ночи, останавливали, добавляя 1 М NaBH<sub>3</sub>CN (Merck, ФРГ) до концентрации 10 мМ и после инкубации в течение 1 ч при  $20^{\circ}\text{C}$  смесь диализовали против PBS. Конъюгат очищали гель-фильтрацией на колонке (1,0 × 50 см) с TSK-Gel HW-55S (Toyo-Soda, Япония) и хранили при  $-20^{\circ}\text{C}$  в 50% глицерине.

*Подкласс МА определяли методом двойной диффузии в 1% агарозе.* Использовали кроличьи антитела против подклассов иммуноглобулинов мыши (Gibco, BRL, Австрия). Линии преципитации образовывались через 12—24 ч инкубации во влажной камере при  $20^{\circ}\text{C}$ .

*K<sub>св</sub> определяли с помощью неконкурентного ИФА [5] согласно формуле*

$$K_{\text{св}} = \frac{1}{4[\text{MA}'] - 2[\text{MA}]},$$

где [MA] — концентрация антител, соответствующая 50% связыванию от максимального при определенной концентрации антигена, [MA'] — концентрация антител, соответствующая 50% связыванию от максимального при вдвое меньшем количестве антигена.

*Электрофорез* проводили в камере CE-2/4 (Pharmacia, Швеция) в SDS-ПААГ с линейным градиентом геля 4—20% в трис-ацетатном буфере, pH 7,4 (напряжение 200 В). Подготовку образцов и окрашивание геля проводили как описано в работе [13].

*Приготовление конъюгата МА с частицами латекса.* 1 мл 3—5% суспензии латекса смешивали с равным объемом PBS и с 1 мл раствора МА в PBS (120—140 мкг/мл). Смесь инкубировали при встряхивании в течение ночи при  $4^{\circ}\text{C}$  или 3—4 ч при  $20^{\circ}\text{C}$ . Конъюгат 3 раза отмывали в PBS с 1% белковым стабилизатором.

*Проведение реакции латекс-агглютинации.* Препарат, содержащий вирус, титровали в микропланшетах с U-образным дном по 50 мкл в лунку. Затем в лунки вносили конъюгат латекса с антителом (конъюгат разводили PBS с 1% БСА так, чтобы концентрация латекса составляла 0,2%) и оставляли на несколько часов при  $20^{\circ}\text{C}$ . Для контроля конъюгат вносили в лунки, не содержащие вируса. При положительной реакции частицы латекса образовывали «зонтик» на дне лунки, а при отрицательной — точки.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lankow R. K., Woodhead S. H., Patterson R. I., Massey R., Schochetman G. // Plant Disease. 1984. V. 68. № 12. P. 1100—1101.
2. Атабеков И. Г. Биотехнология. М.: Наука, 1984. С. 234—238.
3. Простяков А. П., Бобкова А. Ф. // Журн. Всесоюз. хим. о-ва им. Д. И. Менделеева. 1982. Т. XXVII. № 4. С. 643—648.
4. Саарма М. Ю., Ярвекюль Л. В. // Журн. Всесоюз. хим. о-ва им. Д. И. Менделеева. 1989. Т. XXXIV. № 1. С. 77—80.
5. Torrance L., Pead M. T. // Develop. Appl. Biol. 1986. № 1. P. 89—101.

\* RZ — соотношение  $A_{403}/A_{280}$ .

6. Spitz M., Spitz L., Thorpe R., Eugui E. // J. Immunol. Meth. 1984. V. 70. № 1. P. 39—43.
7. Hong T.-H., Chem S.-T., Tang T.-K., Wang S.-C., Chang T.-H. // J. Immunol. Meth. 1989. V. 120. № 1. P. 151—157.
8. Neoh S. H., Gordon C., Potter A., Zola H. // J. Immunol. Meth. 1986. V. 91. P. 231—235.
9. Köhler G., Milstein C. // Nature. 1975. № 256. P. 495—497.
10. Ey P. L., Prowse S. J., Jenkin C. R. // Immunochem. 1978. V. 15. P. 429—436.
11. Beatty J. D., Beatty G. B., Vlahos W. G. // J. Immunol. Meth. 1987. V. 100. № 1. P. 173—179.
12. Davies D. L., Clark M. F. // Ann. Appl. Biol. 1983. V. 103. P. 439—448.
13. Polyacrylamide Gel Electrophoresis Laboratory techniques. Pharmacia Fine Chemicals brochure, Revised edition, 1983.

Поступила в редакцию  
15.II.1990

T. N. PLECHKO, A. V. KIRILLOV, S. M. AMBROSOVA, O. V. BORISOVA \*,  
A. G. ODINETZ \*

### MONOCLONAL ANTIBODIES IN PHYTOVIRUS DIAGNOSTICS

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy  
of Sciences of the USSR, Moscow;*

\* *M. V. Lomonosov Moscow State University*

To devise immunodiagnosics of phytoviruses, monoclonal antibodies (Mab's) of the IgG and IgM classes to *Arabis mosaic virus* (AMV) have been prepared and conjugated with horse-raddish peroxidase. The subclass of Mab's and their antigen binding constants have been determined. To find an optimal way of the virus diagnostics in purified preparation and plant juice, variants of the direct and indirect ELISA have been compared. The sensitivity of the ELISA diagnostics has been 2—3 ng AMV per milliliter. We have also developed one-step latex test with very similar sensitivity, applicable to AMV determination.