



УДК 578.85/86.083.3

© 1992 г. С. М. Амбросова, А. В. Кириллов, Е. А. Сухачева,  
А. Ф. Бобкова\*, Н. М. Нацвлишвили\*, Ю. С. Малофеева,  
И. Г. Атабеков\*

## МОНОКЛОНАЛЬНАЯ ИММУНОФЕРМЕНТНАЯ ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВИРУСА ОГУРЕЧНОЙ МОЗАИКИ

*Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина РАН, Москва;*

*\* Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,  
кафедра вирусологии биологического факультета*

Получены гибридомы, продуцирующие моноклональные антитела (МА) к вирусу огуречной мозаики (Cucumber mosaic virus, CMV). Антитела выделены из асцитной жидкости путем осаждения сульфатом аммония с последующей хроматографией на белок-А-сефарозе. Определен подкласс МА и константа их связывания ( $K_d$ ) с антигеном. Подобрано оптимальное сочетание двух клонов, необходимое для конструирования иммуноферментной тест-системы. Определены возможности применения этих клонов в качестве сенсibilизирующих и проявляющих антител при постановке сэндвич-варианта ИФА. Проведено сравнительное определение вируса в экстрактах из листьев зараженных растений в трех постановках сэндвич-варианта ИФА — моноклональной, поликлональной и комбинированной. Показано, что иммуноферментная диагностическая тест-система на основе МА позволяет определять вирус в концентрациях 1–5 нг/мл при практически полном отсутствии неспецифического связывания.

За последние несколько лет возрос интерес к использованию МА для индикации фитовирусов [1–3]. В настоящее время МА получены более чем к 30 вирусам растений, включая наиболее распространенные и вредоносные вирусы картофеля, овощей, плодовых и цветочно-декоративных культур [4, 5]. МА легли в основу создания нового поколения иммунодиагностикумов, в которых традиционные поликлональные сыворотки заменены моноклональными антителами. Это существенно повысило качество тест-систем, их аналитическую надежность и стандартистность [6–8]. Кроме того, гибридомная технология дала возможность целенаправленно конструировать тест-системы и во многом устранила те недостатки, которые присущи традиционной технологии получения антисывороток. К тому же возможность получения МА практически в неограниченном количестве создает основу для организации крупномасштабного производства без дополнительных затрат, связанных с дорогостоящей и трудоемкой процедурой получения высокоочищенных вирусных препаратов.

Целью настоящей работы является разработка иммуноферментной диагностической тест-системы на основе МА для определения вируса огуречной мозаики (CMV) — широко распространенного во всех регионах возбудителя, поражающего более 40 видов культурных растений.

В ходе выполнения работы было необходимо решить следующие задачи:

Использованы сокращения: МА — моноклональные антитела, CMV — вирус огуречной мозаики; ИФА — иммуноферментный анализ; ПХ — пероксидаза хрена; БСА — бычий сывороточный альбумин; PBS — фосфатно-солевой буфер; НАТ — среда, содержащая  $10^{-4}$  М гипоксантин,  $4 \cdot 10^{-3}$  М ампиноптерин и  $1,6 \cdot 10^{-5}$  М тимидин; НТ — среда, содержащая  $10^{-4}$  М гипоксантин и  $1,6 \cdot 10^{-3}$  М тимидин; FCS — эмбриональная телячья сыворотка.

получить серию гибридом, продуцирующих МА, специфичные с CMV;  
 подобрать оптимальную комбинацию антител, обеспечивающую максимальную чувствительность тест-системы;  
 определить оптимальные условия применения сенсibiliзирующих и проявляющих антител в сэндвич-варианте ИФА;  
 обеспечить максимальную чувствительность определения CMV в растительных экстрактах;  
 провести сравнительный анализ тест-систем на основе поли- и моноклональных антител.

Основные показатели, по которым оценивалась система:

специфичность, определяемая избирательным взаимодействием антител с искомым антигеном и отсутствием реакции с гетерологичным вирусом;

чувствительность как наименьшая определяемая концентрация антигена;

воспроизводимость результатов и их достоверность при повторном тестировании одних и тех же проб.

При оценке пригодности МА для использования в тест-системе принимались во внимание пролиферативная активность гибридом и интенсивность их антителообразования.

Из пяти полученных клеточных линий, продуцирующих МА к CMV, для дальнейшей работы отобрали две (K12 и K51), обладающие наибольшим титром продуцируемых антител в культуральной жидкости и стабильно растущие в виде асцитной опухоли. В табл. 1 представлены некоторые характеристики антител.

Известно, что чувствительность иммуноферментной системы в модификации сэндвич-варианта ИФА во многом определяется как аффинностью антител, используемых на стадии сенсibiliзации, так и аффин-

Таблица 1

Некоторые характеристики МА, взаимодействующих с CMV

| Гибридома | Титр культуральной жидкости | Титр асцитной жидкости | Субкласс | $K_d \cdot 10^{-9}, M^{-1}$ |
|-----------|-----------------------------|------------------------|----------|-----------------------------|
| K12       | $6,0 \cdot 10^3$            | $> 10^6$               | IgG1     | 2,0                         |
| K51       | $1,2 \cdot 10^3$            | $10^5 - 10^6$          | IgG2b    | 1,2                         |
| K14       | $1,9 \cdot 10^2$            |                        | н. о. *  |                             |
| K421      | $1,2 \cdot 10^2$            |                        | »        |                             |
| K411      | $8,0 \cdot 10$              |                        | »        |                             |

\* н. о. — не определялся.

Таблица 2

Чувствительность иммуноферментного определения CMV\* с помощью моноклональных и поликлональных антител (нг/мл)

| Конъюгат с пероксидазой | Антитела, использованные для сенсibiliзации |      |                |
|-------------------------|---------------------------------------------|------|----------------|
|                         | K12                                         | K51  | поликлональные |
| K12                     | 40-60                                       | 1-3  | н. о.          |
| K51                     | 1-3                                         | 5-10 | 1-3            |
| Поликлональный          | 4-6                                         | 4-6  | 1-3            |

\* Определение см. в «Экспер. части».

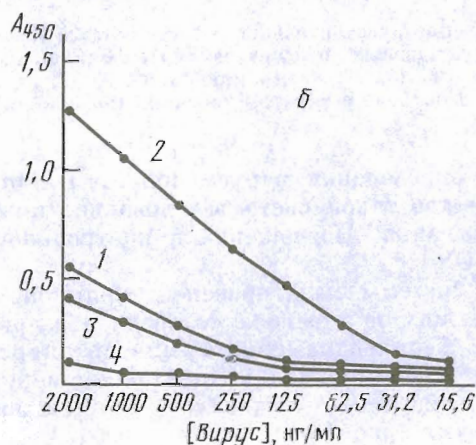
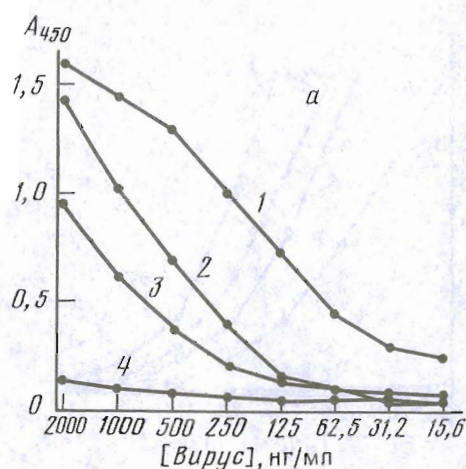


Рис. 1. Определение CMV в очищенном препарате в тест-системах с применением для сенсibilизации твердой фазы МА K51 (1), K12 (2), K421 (3) и конъюгатов K12-ПХ (а) и K51-ПХ (б). Кривая 4 – контроль с вирусом табачной мозаики. Субстрат пероксидазной реакции – 5-аминосалициловая кислота

ностью применяемого конъюгата антител с ферментом. Учитывая это, на первом этапе работы каждое из антител, использованных для сенсibilизации, было изучено в комбинации с каждым из двух конъюгатов, полученных с пероксидазой хрена (K12-ПХ и K51-ПХ). Для контроля специфичности антител их проверяли на взаимодействие с вирусом табачной мозаики.

Из полученных результатов титрования CMV в разных вариантах тест-систем (рис. 1) следует, что применение МА одного и того же клона в качестве сенсibilизирующих и проявляющих автител, т. е. систем типа K12-K12-ПХ и K51-K51-ПХ, позволяло выявить вирус в диапазоне концентраций 30–60 нг/мл. Применение для сенсibilизации K421 не улучшило показателей системы.

Наилучшие результаты были получены при использовании комбинации МА двух клонов – K12 и K51, в которой одни МА сорбировались на подложку, а вторые применялись в виде конъюгата с пероксидазой;

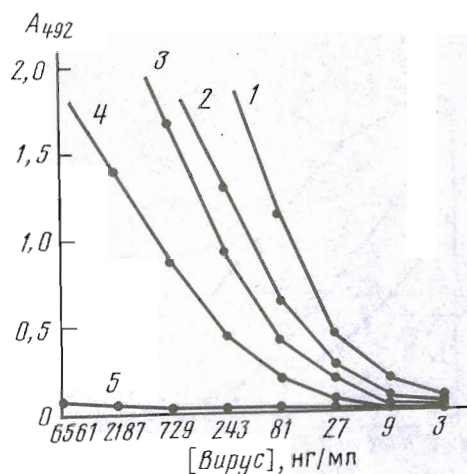


Рис. 2. Определение чувствительности тест-системы К12 – К51-ПХ с применением пероксидазных субстратов: орто-фенилендиамина (1, 2) и 4-аминоантипирина (3, 4); время инкубации 10 (1, 3) и 60 мин (2, 4). Контроль с вирусом табачной мозаики (5)

чувствительность определения вируса при этом составляла 1–3 нг/мл. Важное преимущество такой системы — довольно низкий уровень неспецифического связывания. Поглощение в контрольном варианте не превышало 0,05–0,1 ОЕ.

Применимость системы была проверена при использовании субстратных смесей, состоящих из перекиси водорода и различных органических субстратов (орто-фенилендиамин, 4-аминоантипирин и 5-аминосалициловой кислоты). Минимальная концентрация определяемого антигена для этих трех субстратов составляет соответственно 1–5, 10–12, (рис. 12) и 1–5 нг/мл (рис. 16).

Для оценки пригодности тест-системы при работе с растительными материалами было проведено определение СМВ в экстрактах зараженных листьев табака и хризантемы (рис. 3). Положительную реакцию в листьях табака наблюдали при разведении экстракта  $1:10^3$ , а в инфицированных листьях хризантемы — при разведении более чем  $1:10^4$ . Неспецифическое взаимодействие с посторонними растительными компонентами не превышало 0,1 ОЕ.

По данным некоторых авторов, использование поликлональных антител в качестве подложки или в виде конъюгата с ферментом может повысить чувствительность определения и в то же время устранил «узкую» специфичность, свойственную моноклональным системам [9–11]. С учетом этого было проведено сравнительное определение СМВ в очищенных препаратах и инфицированных экстрактах листьев табака и дурмана в поликлональном, комбинированном и моноклональном вариантах ИФА (рис. 4). Из приведенных кривых титрования видно, что чувствительность порядка 1–5 нг/мл достигается практически во всех трех системах, однако специфичность определения при применении конъюгата МА с ферментом намного выше. В листьях дурмана вирус лучше всего выявлялся с помощью моноклональной системы (при разведении экстракта  $1:640$ ), намного слабее определение в комбинированном варианте ( $1:30$ ) и практически не определялся с помощью поликлональной системы.

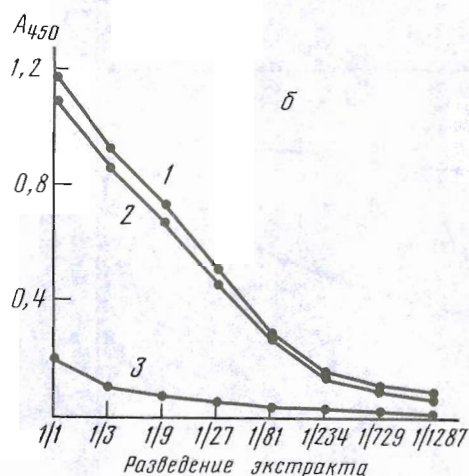
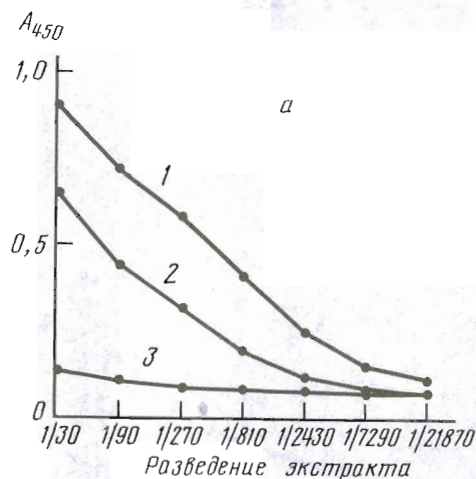


Рис. 3. Определение СМВ с помощью моноклональных антител в растительных экстрактах из табака (а) и листьев хризантемы (б) с помощью тест-систем К51 – К12-ПХ (1) и К12 – К51-ПХ (2); 3 – контроль с экстрактом здорового растения; субстрат – 5-аминосалициловая кислота

Аналогичную закономерность наблюдали и при работе с экстрактом из листьев табака. Так, в моноклональной системе вирус определялся при разведении экстракта много больше 1 : 1280, в комбинированной – 1 : 1000 и в поликлональной системе – 1 : 100.

Обобщающие результаты подбора антител для создания иммуноферментной системы представлены в табл. 2.

Варианты тест-систем, основанные на разных комбинациях моноклональных и поликлональных антител, обеспечивали определение СМВ в диапазоне концентраций 1–10 нг/мл, за исключением тест-системы, базирующейся на одном моноклоне К12. Однако сопоставление кривых 1 на рис. 4а–б показывает несомненное преимущество моноклонального варианта в уровне специфичности определения. Экспериментальные данные, полученные на растительном материале (кривые 2, 3), подтверждают это с убедительной достоверностью.

Таким образом, разработана диагностическая тест-система, позволяющая проводить определение вируса огуречной мозаики в очищенных пре-

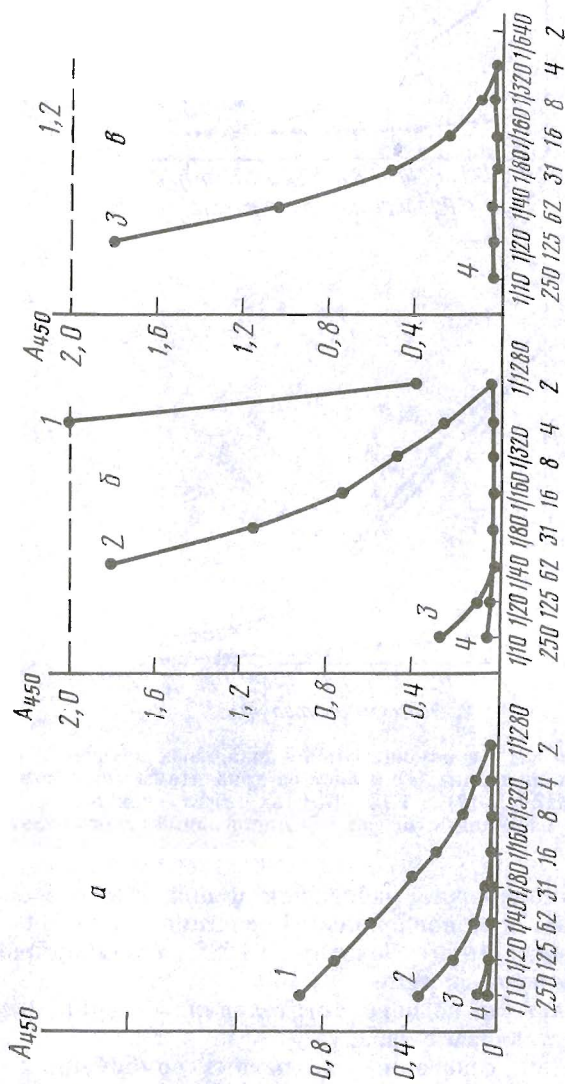


Рис. 4. Сравнительное определение СМУ с помощью поли- и моноклональных тест-систем: а — моноклональная тест-система; б — поликлональная тест-система. Для сенсibilизации и конъюгации с пероксидазой хрена использованы поликлональные антитела; в — комбинация тест-систем. Сенсibilизация поликлональными антителами, конъюгат — К51-ПХ; в — моноклональная тест-система. Сенсibilизация — К12, конъюгат — К51-ПХ. 1 — очищенный вирусный препарат; 2 — экстракт из листьев табака; 3 — экстракт из листьев турмана; 4 — контроль с экстрактом здорового растения. По оси абсцисс верхняя строка — разведение экстракта, нижняя — концентрация вируса (нг/мл)

паратах в диапазоне концентраций 1–5 нг/мл, а также в экстрактах зараженных растений. Она основана на экспериментальном подборе пары МА, одно из которых используется для покрытия твердой фазы, а другое — для выявления связанного вируса.

### Экспериментальная часть

В работе использовали среды DMEM, NAT-DMEM, NT-DMEM (Gibco, Англия), эмбриональную телячью сыворотку (Gibco, Англия), адъювант Фрейнда (Calbiochem, США), кроличьи поликлональные антитела к CMV (кафедра вирусологии МГУ), кроличьи антимышинные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена (DAKO-Immunoglobulins, Дания), пероксидазу хрена (Boehringer-Mannheim, ФРГ), орто-фенилендиамина (Sigma, США), 4-аминоантипирин (НПО «Биолар», Латвия), 5-аминосалициловую кислоту отечественного производства, полиэтиленгликоль-1500 (Merck, ФРГ), диметилсульфоксид (Merck, ФРГ), набор для изотипирования подклассов иммуноглобулинов (Calbiochem, США), пристав (Sigma, США), бычий сывороточный альбумин (Serva, ФРГ), Твин-20 (Sigma, США), белок А-сефарозу (Pharmacia, Швеция), TSK-Gel HW-55S (Toyo Soda, Япония), 96-луночные планшеты для иммуноанализа Maxisorp (NUNC, Дания), 24- и 96-луночные планшеты для культур клеток (Linbro, Flow Lab, Англия).

В качестве антигена в работе использовали очищенный препарат CMV, любезно предоставленный Т. А. Атабековой (кафедра вирусологии биологического факультета МГУ). Накопление и выделение CMV проводили по стандартному методу, изложенному в работе [12]. Очищенный вирус хранили в 50% глицерине при  $-20^{\circ}\text{C}$ .

*Получение моноклональных антител к CMV.* Для получения иммунных спленоцитов мышей линии BALB/c иммунизировали введением внутрибрюшинно 50–100 мкг очищенного вирусного препарата трехкратно с 2-недельным интервалом. Первую иммунизацию проводили в полном адъюванте Фрейнда, последующие — в неполном. Титр антител в сыворотке крови иммунизированных животных достигал  $10^4$ – $10^5$ . Спленоциты иммунной мыши гибридизовали с миеломой Ag8.653.X63 по методу Келлера и Мильштейна [13]. Соотношение клеток 1:1. Для слияния использовали стерильный 50% раствор полиэтиленгликоля-1500. Суспензию клеток после гибридизации центрифугировали, отмывали средой DMEM и осадок осторожно разбавляли селективной средой NAT-DMEM, содержащей 10% FCS, и распределяли по 0,5 мл в лунку по четырем 24-луночным планшетам, в которые накануне вносили суспензию перитонеальных макрофагов мыши. Планшеты инкубировали 10–14 сут при  $37^{\circ}\text{C}$  и содержания  $\text{CO}_2$  5% до появления гибридных клонов, после чего дважды через сутки меняли 50% среды и затем проводили тестирование на синтез специфических антител методом ИФА.

*Гибридомы клонировали* методом лимитирующего разведения. Для этого в среде NT-DMEM с 10% FCS готовили по 20 мл суспензии, содержащей 30 000, 3000, 300 и 30 клеток. Полученные суспензии распределяли по 96-луночным планшетам, в которые накануне вносили суспензию перитонеальных макрофагов мыши. Тестирование моноклонов на 14–21-е сут культивирования проводили сэндвич-вариантом ИФА, используя для сенсibilизации твердой фазы кроличьи поликлональные антитела в концентрации 5 мкг/мл. Затем последовательно вносили вирусный препарат в концентрации 5 мкг/мл и тестируемую культуральную жидкость. В качестве проявляющих антител применяли кроличьи антимышинные антитела, конъюгированные с пероксидазой, в рабочем разведении. В качестве хромогенного вещества использовали орто-фенилендиамина. Оп-

тическое поглощение измеряли с помощью сканирующего спектрофотометра с вертикальным лучем «Titertek Multiskan» (Flow, Англия) при длине волны 492 нм.

Первичные гибридные культуры клонировали не менее 2 раз, отбирая на каждом этапе субклоны с наибольшей пролиферативной активностью и устойчивым синтезом МА. ИФА-титры в среде культивирования в среднем составляли  $10^2$ – $10^3$ .

Гибридомы хранили в криозащитной среде, состоящей из 85% FCS и 15% диметилсульфоксида в контейнерах с жидким азотом.

*Получение моноклональных антител в препаративных количествах.* Гибридомы в количестве  $5 \cdot 10^6$ – $10^7$  клеток вводили мышам линии BALB/c, которым предварительно за 7–10 сут ввели по 0,5 мл pristana. Через 14–16 сут мышей с выраженным ростом асцита забивали, собирали асцитную жидкость, центрифугировали ее 5 мин при 1000 об/мин. Супернатант собирали и хранили при  $-20^\circ\text{C}$ . В асцитной жидкости титр антител составлял  $10^5$ – $10^6$ . Иммуноглобулиновую фракцию из асцитной жидкости осаждали насыщенным раствором сульфата аммония до 50% насыщения. Осадок растворяли в минимальном объеме PBS и диализовали против PBS. Затем диализат подвергали аффинной хроматографии на белок А-сефарозе по методу [14]. Концентрацию антител определяли на спектрофотометре Ultrospec 4050 (LKB, Швеция).

*Подкласс МА* определяли методом ИФА с использованием кроличьих антител против подклассов иммуноглобулинов мыши по прилагаемой к набору инструкции.

*Константу связывания антител с эпитопами на поверхности антигена* определяли с помощью неконкурентного ИФА [15].

*Конъюгаты МА с пероксидазой хрена* получали по методу [16]. Конъюгат подвергали гель-фильтрации на колонке (1,0×50 см) с TSK-Gel HW-55S для отделения его от свободных антител и фермента, а также высокомолекулярных полимеров конъюгата. Полученный конъюгат смешивали с равным объемом глицерина и хранили при  $-20^\circ\text{C}$ .

*Получение растительных экстрактов.* Листья зараженных растений растирали в фарфоровой ступке с добавлением фосфатного буферного раствора в соотношении 1 : 5–1 : 10 (вес растения к объему буфера).

*CMV определяли* с помощью разработанной тест-системы в сэндвич-варианте ИФА. В качестве твердой фазы использовали полистирольные планшеты для ИФА с 96 лунками (Nunc, Дания). Последовательность операций:

сенсibilизация твердой фазы одним из клонов в концентрации 5 мкг/мл в 50 мкл PBS и инкубирование в течение ночи при  $4^\circ\text{C}$  или в течение 2 ч при  $37^\circ\text{C}$ ;

внесение 1% раствора BCA в PBS и инкубирование при  $20^\circ\text{C}$  в течение 1 ч;

внесение 50 мкл вируссодержащего материала, последовательно разбавленного PBS, содержащим 0,05% Твин-20 (PBS – Твин), и инкубирование при  $20^\circ\text{C}$  в течение 2 ч;

внесение 50 мкл МА, конъюгированных с пероксидазой, в PBS – Твин в рабочем разведении и инкубирование при  $20^\circ\text{C}$  в течение 1 ч;

внесение 50 мкл субстратной смеси и инкубирование при  $20^\circ\text{C}$  в течение 15–20 мин;

остановка реакции внесением 50 мкл 1 М  $\text{H}_2\text{SO}_4$ .

Между стадиями планшеты промывали 3–5 раз PBS – Твин. В качестве субстратов для пероксидазы использовали орто-фенилендиамин ( $\lambda$  492 нм), 5-аминосалициловую кислоту ( $\lambda$  450 нм) и 4-аминоантипирин ( $\lambda$  492 нм) с 0,03% перекиси водорода. Результаты представляли в виде зависимости величины оптического поглощения образовавшегося продук-

та ферментативной реакции от концентрации антигена в пробах (кривые титрования). За чувствительность метода принимали концентрацию антигена (или разведение анализируемого растительного экстракта), при которой регистрируемая величина оптического поглощения продукта пероксидазной реакции в 2 раза превышает поглощение в контрольной пробе. В качестве контроля при тестировании вирусов использовали препарат вируса табачной мозаики, а также экстракт из листьев здоровых растений.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Атабеков И. Г. // Биотехнология / Ред. А. А. Баев. М.: Наука 1984. С. 234–238.
2. Sander E., Dietzgen R. G. // Adv. Virus Res. 1981. V. 29. P. 131–162.
3. Van Regenmortel M. V. // Microbiol. Sci. 1984. V. 1. № 3. P. 73–77.
4. Саарма М. Ю., Яркеюльз Л. В. // Журн. Всесоюз. хим. о-ва им. Д. И. Менделеева. 1989. Т. XXXIV. № 1. С. 77–80.
5. Простяков А. П., Бобкова А. Ф. // Журн. Всесоюз. хим. о-ва им. Д. И. Менделеева. 1982. Т. XXVII. № 4. С. 643–648.
6. Цыциков Э. Н., Юрин Б. Л., Василев Р. Г. // Иммунология. 1989. № 3. С. 70–73.
7. Lankow R. K., Woodhead S. H., Patterson R. I., Massey R., Schochetman G. // Plant Disease. 1984. V. 68. № 12. P. 1100–1101.
8. Энгельгардт В. А., Венгеров Ю. Ю. // Докл. ВАСХНИЛ. 1984. № 7. С. 11–13.
9. Воробьев С. М., Северина М. Е., Старовойтова Т. А., Гудима С. О., Соколов А. В., Венгеров Ю. Ю. // Биотехнология. 1991. № 4. С. 82–86.
10. Плечко Т. Н., Кириллов А. В., Амбросова С. М., Борисова О. В., Одинец А. Г. // Биооргани. химия. 1991. Т. 17. № 2. С. 223–231.
11. Гнутова Р. В. Иммунологические исследования в фитовирусологии. М.: Наука, 1985. С. 61–63.
12. Lot H. et al. // Ann. Phytopathol. 1972. № 4.
13. Kohler G., Milstein C. // Nature. 1975. № 256. P. 495–497.
14. Ey P. L., Prowse S. J., Jenkin C. R. // Immunochemistry. 1978. V. 15. P. 429–436.
15. Beatty J. D., Beatty G. B., Vlahos W. G. // J. Immunol. Meth. 1987. V. 100. № 1. P. 173–179.
16. Nakane P. K. // Immunoassays: Clinical Laboratory Techniques for the 1980s. P. 157–169.

Поступила в редакцию  
14.I.1992

После доработки  
13.III.1992

S. M. AMBROSOVA, A. V. KIRILLOV, E. A. SOUKHATCHOVA, A. F. BOBKOVA\*,  
N. M. NATSVLISHVILI\*, Yu. S. MALOFEYEVA, I. G. ATABEKOV\*

#### A MONOCLONAL IMMUNOENZYMATIC TEST-SYSTEM FOR THE CUCUMBER MOSAIC VIRUS DETECTION

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

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

Hybridomas producing monoclonal antibodies (Mab's) to cucumber mosaic virus (CMV) were obtained. Mab's were isolated from ascitic fluid by precipitation with ammonium sulphate followed by the affinity chromatography purification on Protein A-Sepharose. Subclasses of two Mab's and their antigen binding constants were determined. An optimal combination of two clones necessary for the construction of the immunoenzymatic test-system was selected. To find the optimal way of virus diagnostics in infected plants' juices, three variants of «sandwich»-ELISA (monoclonal, polyclonal and hybrid) were compared. Sensitivity of ELISA assay with a combination of two Mab's (K12 and K51) proved to be 1–5 ng CMV per milliliter.