



УДК 578.857.1.083.3

## ИММУНОФЕРМЕНТНАЯ ТЕСТ-СИСТЕМА НА ОСНОВЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВИРУСА ШТРИХОВАТОЙ МОЗАИКИ ЯЧМЕНЯ

© 1995 г. Е. А. Сухачева<sup>#</sup>, В. К. Новиков\*, Д. Ю. Плаксин\*\*, И. С. Павлова

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,  
117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10;

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

\*\* Институт экологии и генетики микроорганизмов  
Уральского отделения РАН, Пермь

Поступила в редакцию 20.02.95 г.

На основе полученного ранее набора моноклональных антител к вирусу штриховатой мозаики ячменя (*Barley stripe mosaic virus*) разработана иммуноферментная тест-система для выявления вируса в очищенном вирусном препарате и в экстрактах листьев и семян зараженных растений. Сравнивали различные варианты прямого сэндвич-ИФА и систему с применением биотинилированных моноклональных антител и конъюгатов стрептавидина с пероксидазой хрена. Чувствительность определения вируса в прямом сэндвич-ИФА составила 26 нг/мл. Введение в систему биотинилированных моноклональных антител и конъюгата стрептавидина с пероксидазой хрена позволило повысить чувствительность до 13 - 14 нг/мл, а применение стрептавидина, конъюгированного с гомополимером пероксидазы из хрена, дало возможность определять вирус в концентрации 4 нг/мл.

*Ключевые слова:* вирус штриховатой мозаики ячменя, моноклональные антитела, иммуноферментная тест-система.

Вирус штриховатой мозаики ячменя (*Barley stripe mosaic virus* – BSMV), типичный и наиболее изученный представитель группы *Hordeiviruses*, поражающий зерновые культуры, представляет собой палочкообразный РНК-содержащий вирус с многокомпонентным геномом, причем разные штаммы BSMV имеют разный набор РНК [1, 2]. Все геномные РНК BSMV несут на 3'-конце тРНК-подобную структуру, способную акцептировать тирозин и внутренний poly(A)-блок разной длины [3, 4]. Капсид BSMV построен из идентичных белковых субъединиц, расположенных по спирали. Белок оболочки BSMV, ген которого локализован на 5'-концевом участке одной из геномных РНК (РНК2а) [5], является гликопротеином [6] и способен к реполимеризации с образованием стабильных промежуточных белковых агрегатов, а также может инкапсулировать чужеродную РНК [7]. BSMV способен непонятным пока образом индуцировать мутации в растении-хозяине [8].

Сокращения: МА – моноклональные антитела; BSMV – вирус штриховатой мозаики ячменя; ИФА – иммуноферментный анализ; ПХ – пероксидаза хрена; PAL – полиакролеиновый латекс; BSA – бычий сывороточный альбумин; PBS – фосфатно-солевой буфер (0.01 M Na-фосфат, 0.15 M NaCl, pH 7.2); Вt – биотин.

<sup>#</sup> Автор для переписки.

Потери урожая, обусловленные присутствием BSMV, составляют по разным источникам от 20 до 35% [9, 10]. Основным фактором в эпидемиологии BSMV является передача вируса через семена инфицированных растений, что способствует быстрому распространению заболевания. Первым серологическим методом, использованным для диагностики BSMV, был метод двойной диффузии [11, 12], который помимо низкой чувствительности имел такой недостаток, как необходимость предварительного разрушения вирусных частиц, что нежелательно, поскольку мономер белка оболочки серологически не идентичен интактному BSMV [13]. Более чувствительными были использованные позднее методы латексной агглютинации [14] и ИФА [15], позволявшие выявлять одно инфицированное семечко на 1000 здоровых, а также радиоиммуноанализ [16] и иммуноэлектронная микроскопия [17]. Однако два последних метода весьма дорогостоящи и непригодны для проведения массовых анализов.

Цель данной работы – создание на основе МА иммуноферментной тест-системы для определения BSMV. Были использованы полученные ранее МА к BSMV [18] (некоторые их характеристики представлены в табл. 1). В качестве отправного пункта в разработке тест-системы был

**Таблица 1.** Некоторые характеристики МА, взаимодействующих с BSMV

| МА   | Субкласс | $K_a, M^{-1}$        |
|------|----------|----------------------|
| B1   | IgG2a    | $2.8 \times 10^{10}$ |
| B7   | IgG2a    | $1.5 \times 10^9$    |
| H9   | IgG1     | $1.6 \times 10^{10}$ |
| B5   | IgM      | $2.3 \times 10^7$    |
| B6   | IgM      | $4.1 \times 10^7$    |
| 2A11 | IgG1     | $4.3 \times 10^6$    |

**Таблица 2.** Чувствительность определения BSMV в различных вариантах прямого сэндвич-ИФА, нг/мл

| Сенсибилизирующие МА              | Конъюгат |         |         |
|-----------------------------------|----------|---------|---------|
|                                   | B1-ПХ    | H9-ПХ   | 2A11-ПХ |
| B1                                | 26       | 30      | 32      |
| B7                                | 68       | 70      | 125     |
| H9                                | 35       | 45      | 60      |
| 2A11                              | 50       | 60      | 60      |
| B5                                | 30       | 26      | 60      |
| B6                                | 60       | 60      | 60      |
| Кроличья поликлональная сыворотка | 65       | 80 - 90 | 125     |

выбран вариант прямого сэндвич-ИФА, при котором вирусные частицы, содержащиеся в исследуемом материале (экстракты листьев или семян), связываются МА, сорбированными на поверхности микропланшетов, и иммобилизованный таким образом антиген выявляется с помощью конъюгата МА с пероксидазой из хрена. Поскольку ни наши результаты [18], ни более ранние исследования [19] не выявили антигенных различий у разных штаммов BSMV, в данной работе могли быть использованы все имевшиеся у нас МА.

На первом этапе работы были получены конъюгаты пяти МА с ПХ (по непонятным причинам МА B7 не конъюгировались с ферментом) и определены оптимальные условия для иммобилизации МА на твердой фазе. Установлено, что наилучшие результаты достигаются при сорбции иммуноглобулинов G (МА B1, B7, H9, 2A11) в карбонат-бикарбонатном буфере при pH 9.6, а иммуноглобулинов M (МА B5, B6) – в фосфатном буфере при pH 7.4. Оптимальная концентрация сенсибилизирующих антител составляла 1 - 8 мкг/мл. В даль-

нейшем были испытаны все возможные комбинации сенсибилизирующих и детектирующих МА. В ходе предварительных экспериментов было установлено, что при использовании конъюгатов низкоаффинных иммуноглобулинов класса M (B5 и B6) с ПХ наблюдался высокий уровень неспецифического связывания, поэтому в дальнейшем были использованы только конъюгаты ПХ с МА B1, H9 и 2A11 (табл. 2).

Самая высокая чувствительность (26 нг/мл) была отмечена для сочетаний B1 – B1-ПХ и B5 – H9-ПХ. Необходимо отметить, что низкоаффинные МА B5 в комбинации с конъюгатом высокоаффинных МА H9 позволяют добиться такой же чувствительности, как в системе с применением только высокоаффинных МА B1, причем варианты B1 – H9-ПХ и B5 – B1-ПХ лишь немного уступают по чувствительности первым двум системам. Можно предположить, что в связывание вирусной частицы с иммобилизованными на твердой фазе МА B1 и B5 вовлекается общий для эпителий двух данных МА участок полипептидной цепи белка оболочки BSMV и это, по-видимому, и обеспечивает эффективное взаимодействие конъюгата высокоаффинных МА B1 или H9. Так как в системе B5 – H9-ПХ наблюдался несколько больший уровень неспецифического связывания при использовании экстрактов листьев, предпочтение было отдано варианту B1 – B1-ПХ (рис. 1). В этом случае в свежеприготовленном экстракте листьев зараженных растений вирус определялся в разведении до 1 : 30000 - 1 : 40000, а в экстракте семян – в разведении до 1 : 1280.

В большинстве случаев чувствительность иммуноферментных тест-систем, разработанных для детекции фитопатогенных вирусов, составляет 1 - 10 нг/мл. Иногда наилучшие результаты достигались в комбинированной тест-системе при использовании для сенсибилизации твердой фазы поликлональной антисыворотки [20] или смеси МА [21], что, возможно, в некоторой степени аналогично применению поликлональных антител. Иммобилизация на твердой фазе кроличьей поликлональной антисыворотки к BSMV в сочетании с моноклональными конъюгатами не позволила достичь большей чувствительности в прямом сэндвич-ИФА (табл. 2). С учетом относительной эпитопной специфичности МА к BSMV [18] были рассмотрены варианты сенсибилизации твердой фазы смесью МА, направленных к перекрывающимся (B1 + B5) и неперекрывающимся (B1 + B6, B1 + B7, B5 + B7, B5 + B6) эпитопам. Однако во всех случаях чувствительность была не выше 30 нг/мл. Можно предположить, что сравнительно низкая чувствительность во всех рассмотренных вариантах прямого сэндвич-ИФА объясняется тем, что введение ферментной метки непосредственно в МА, которое используется для обнаружения антигена, является причиной

снижения способности МА к связыванию с BSMV. Аналогичная ситуация обсуждается в работах, посвященных изучению ряда потивирусов [22, 23] и лютеовирусов [24], где отмечается, что конъюгирование МА с щелочной фосфатазой замедляет присоединение этих МА к антигену. В результате для достижения такого же уровня интенсивности окраски продуктов ферментативной реакции, как и в других вариантах ИФА (например, при использовании МА в качестве покровных антител в сочетании с поликлональным конъюгатом), требуется в 3 раза больше времени.

Возможность избежать прямого введения ферментной метки в МА открывается при использовании в ИФА системы авидин (стрептавидин) – биотин. При замене в системе В1 – В1-ПХ пероксидазного конъюгата МА В1 на биотинилированные МА В1 с использованием в качестве детектирующего реагента конъюгата стрептавидина с ПХ чувствительность тест-системы повысилась в 2 раза и составила 13 - 14 нг/мл. Дальнейшее усиление ферментативного сигнала может быть достигнуто при использовании конъюгата стрептавидина с полимерной ПХ [25]. В экспериментах с полимерным конъюгатом для сорбции на твердую фазу были использованы МА В1, В5 и Н9, а для биотинилирования – МА В1 и Н9 (В1-В<sub>i</sub>, Н9-В<sub>i</sub>). Все комбинации МА были испытаны с очищенным вирусным препаратом, с экстрактами листьев и экстрактами семян зараженных растений. При этом максимальная чувствительность (4 нг/мл) была достигнута в трех вариантах ИФА: В1 – В1-В<sub>i</sub>, Н9 – Н9-В<sub>i</sub>, В1 – Н9-В<sub>i</sub> (рис. 2). Предлагаемый вариант тест-системы позволяет выявлять BSMV в экстрактах зараженных семян при разведении до 1 : 8000 - 1 : 9000, т.е. имеется возможность обнаружить всего одно больное семя среди более чем 8000 здоровых семян. Достаточно высокая стабильность использованных в данном случае реагентов позволяет рассматривать возможность применения разработанной тест-системы для крупномасштабной диагностики BSMV.

Одним из очень простых и вместе с тем достаточно чувствительных неинструментальных методов иммуноанализа является латекс-тест, описанный, например, при разработке тест-системы для диагностики вируса мозаики резухи (*Arabis mosaic virus*) [26]. Чтобы изучить возможность применения латекс-теста для обнаружения BSMV, высокоаффинные МА В1, В7 и Н9 были конъюгированы с полиакролеиновым латексом (PAL). (Предварительные эксперименты показали непригодность для диагностики вируса с помощью латекс-теста низкоаффинных МА 2А11, относящихся к классу IgG, и МА В5 и В6, относящихся к классу IgM.) Нижний уровень определения BSMV в очищенном препарате составил 4 нг/мл для свежеприготовленного конъюгата В1-PAL, 4 - 8 нг/мл

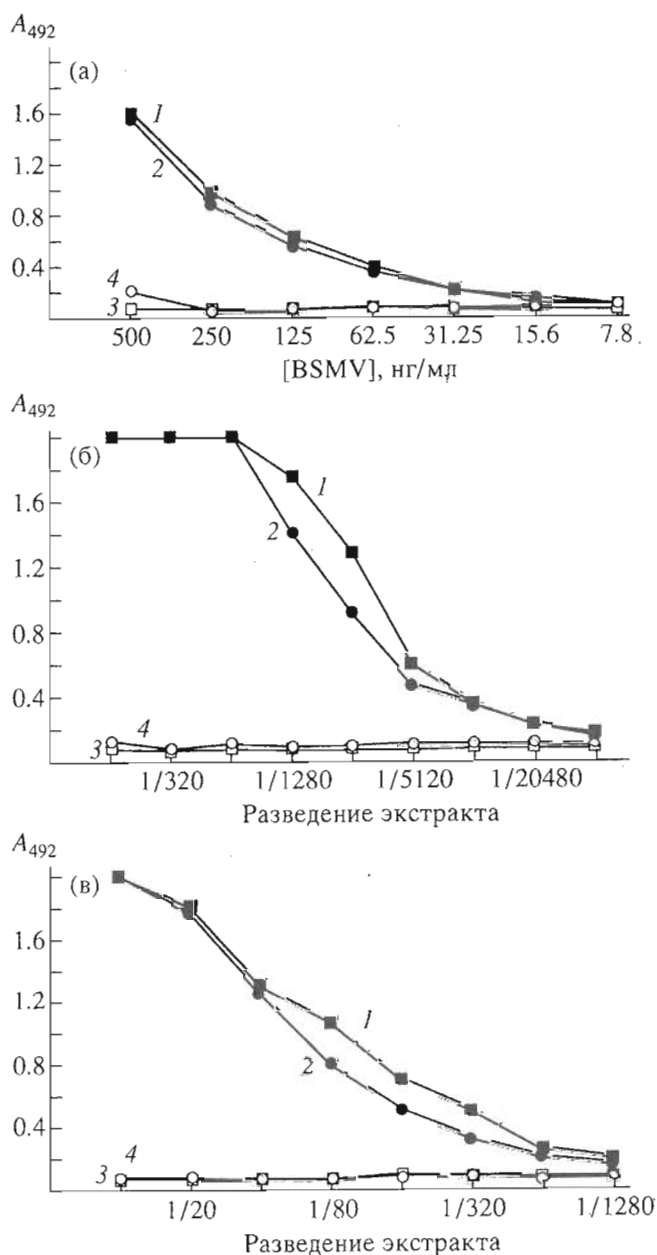
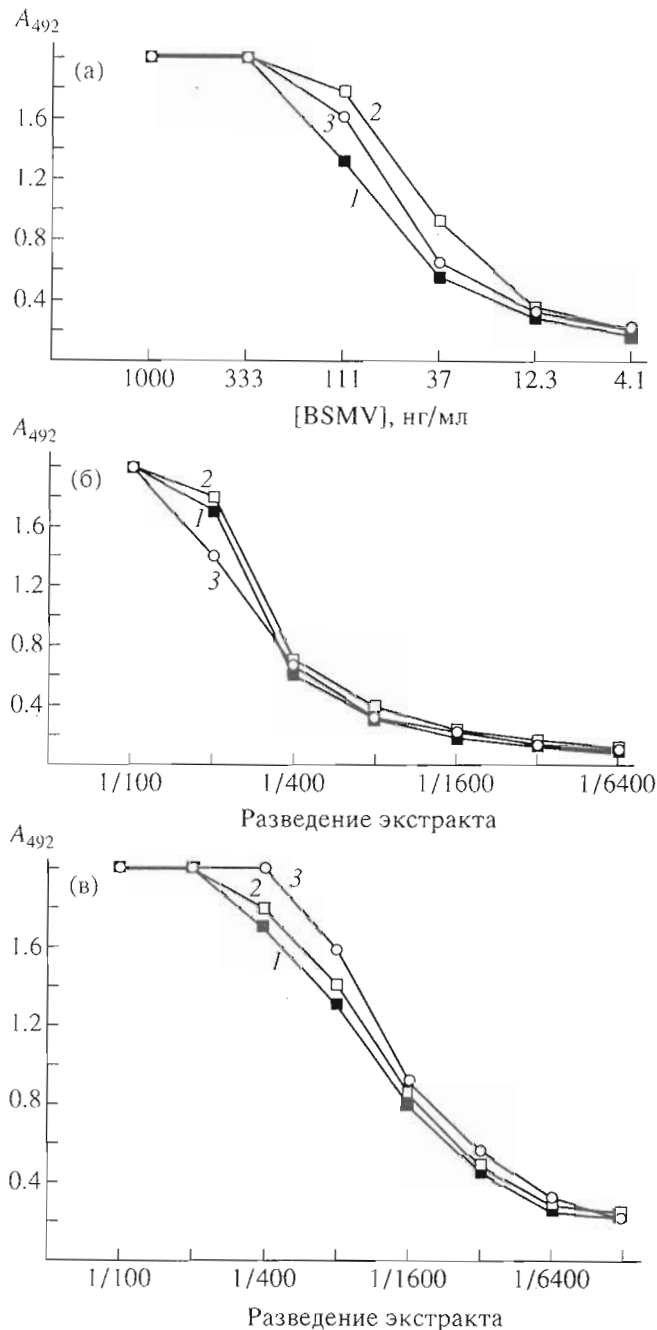


Рис. 1. Определение минимальной выявляемой концентрации BSMV в очищенном препарате вируса (а), в свежеприготовленном экстракте листьев зараженного растения (б) и в экстракте семян зараженного растения (в) с применением двух вариантов прямого сэндвич-ИФА: В1 – В1-ПХ (1) и В5 – Н9-ПХ (2). Контроли в системах В1 – В1-ПХ (3) и В5 – Н9-ПХ (4) с препаратом BSMV (а), с экстрактами листьев (б) и семян (в) здорового растения.

для конъюгата Н9-PAL и 15 - 30 нг/мл для конъюгата В7-PAL. Однако по мере хранения качество диагностикума ухудшалось вследствие нестабильности конъюгатов, и спустя месяц с помощью конъюгата Н9-PAL BSMV уже определялся только в концентрации 25 - 30 нг/мл. Таким образом, в случаях, не требующих строгого соблюдения



**Рис. 2.** Определение минимальной выявляемой концентрации BSMV в очищенном вирусном препарате (а), в экстрактах листьев (б) и семян (в) зараженных растений в тест-системах с применением конъюгата стрептавидина с полимерной ПХ: В1 – В1-В1 (1), В1 – Н9-В1 (2), Н9 – Н9-В1 (3). Уровень неспецифического связывания во всех случаях не превышал  $0.07 \text{ OE}_{492}$  с препаратом вируса табачной мозаики (а),  $0.08 \text{ OE}_{492}$  с экстрактом листьев здорового растения (б) и  $0.1 \text{ OE}_{492}$  с экстрактом семян здорового растения (в).

стандартных условий и количественного анализа, латекс-тест вследствие простоты постановки реакции достаточно перспективен, однако для большого числа анализов его применение ограничено.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали пероксидазу хрена (Boehringer-Mannheim, Германия, или Центр агротехники, г. Львов), орто-фенилендиамин, N-оксисукцинимидный эфир аминокгексаноилбиотина, Твин-20 (Sigma, США), бычий сывороточный альбумин (Serva, Германия), кроличьи поликлональные антитела к BSMV (кафедра вирусологии МГУ), диметилсульфоксид (Merck, Германия), конъюгат стрептавидина с полимерной пероксидазой хрена (SDT Inc., Россия), 96-луночные планшеты для иммуноанализа (Linbro, Flow Laboratories, Англия).

Накопление и выделение BSMV проводили по стандартному методу, изложенному в работе [27]. Очищенный вирус хранили в 50% глицерине при  $-20^\circ\text{C}$ .

**Получение экстрактов листьев или семян.** Растительный материал (листья или семена) предварительно взвешивали, добавляли PBS из расчета 5 мл буфера на 1 г исследуемого материала, измельчали в фарфоровой ступке и осадок отделяли центрифугированием при  $5000g$  в течение 10 мин. Полученный экстракт хранили при  $-20^\circ\text{C}$  в 50% глицерине.

Конъюгаты МА с пероксидазой из хрена получали по методу, предложенному Nakane [28].

**Получение конъюгатов МА с полиакролеиновым латексом.** PAL с диаметром частиц 1.8 мкм, полученный полимеризацией акролеина в водно-щелочной среде в присутствии красителя кристаллического фиолетового [29], был любезно предоставлен сотрудником лаборатории "Полимеры для биологии" Ю.В. Лукиным. К 0.5 мл PBS прибавляли 5 - 20 мкл раствора МА, содержащего от 1 до 15 мкг белка, при перемешивании прибавляли 125 мкл хорошо размешанной 5% суспензии PAL и инкубировали 30 мин при  $56^\circ\text{C}$  или 2 ч при  $20^\circ\text{C}$ . Полученный конъюгат промывали 0.5% раствором BSA в PBS и ресуспендировали в 0.1% растворе BSA в PBS.

**Постановка реакции латекс-агглютинации.** В лунках 96-луночного микропланшета с U-образными лунками готовили последовательные разведения определяемого антигена в PBS в присутствии 0.5% BSA в объеме 25 мкл. Затем в каждую лунку добавляли по 25 мкл 0.15% латексного конъюгата, встряхивали до образования гомогенной суспензии и оставляли при  $20^\circ\text{C}$  на 2 - 3 ч. При положительной реакции суспензия латексного конъюгата после оседания равномерно покрывала дно лунки в виде перевернутого зонтика. При отрицательной реакции конъюгат оседал в виде компактной точки или колечка с четко очерченными краями.

**Биотинилирование иммуноглобулинов.** Раствор МА в PBS диализовали против 0.1 M раствора бикарбоната натрия, pH 8.6, концентрацию

антител доводили до 2.0 - 3.0 мг/мл тем же буфером, добавляли 0.1 объема N-оксисукцинимидного эфира аминоксаноилбиотина в концентрации 1.0 мг/мл в DMSO и инкубировали 2 ч при 20°C, затем диализовали против PBS.

**Определение BSMV методом прямого сэндвич-ИФА.** В лунки 96-луночных планшетов последовательно вносили:

1) 50 мкл сенсибилизирующих антител, инкубировали в течение ночи при 4°C;

2) 100 мкл 1% раствора BSA в PBS, инкубировали 1 ч;

3) 50 мкл вирусосодержащего материала, последовательно разведенного PBS, содержащим 0.05% Твин-20 (PBS-Твин), и инкубировали 1 ч;

4) 50 мкл конъюгата МА-ПХ в рабочем разведении в PBS-Твин, инкубировали 1 ч;

5) 50 мкл субстратного раствора, содержащего 1 мг/мл орто-фенилендиамина в 0.1 М цитратном буфере (рН 5.0) и 0.06% перекиси водорода.

Все этапы, начиная со второго, проводили при 20°C. Между стадиями планшеты промывали 3 - 4 раза PBS-Твин. Развитие окраски останавливали добавлением 50 мкл 1 н. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Оптическое поглощение продуктов ферментативной реакции измеряли на спектрофотометре Titertek Multiskan при длине волны 492 нм.

Конъюгат стрептавидина с пероксидазой хрена получали по методу, описанному в работе [30].

**Определение BSMV с использованием стрептавидин-биотиновой системы.** Первые три стадии проводили так же, как и при постановке прямого сэндвич-ИФА. Затем в лунки вносили по 50 мкл биотинилированных МА в PBS-Твин с 1% BSA, инкубировали 1 ч при 20°C, промывали 3 - 4 раза PBS-Твин, после чего вносили конъюгат стрептавидина с ПХ или полимерной ПХ в рабочем разведении в PBS-Твин с 1% BSA и инкубировали 1 ч при 20°C. Внесение субстратного раствора и последующие стадии проводили аналогично прямому сэндвич-ИФА.

Результаты представляли в виде зависимости величины оптического поглощения образовавшегося продукта ферментативной реакции от концентрации антигена в пробах (кривые титрования). За чувствительность метода принимали концентрацию антигена (или разведение растительного экстракта), при которой регистрируемая величина оптического поглощения продукта ферментативной реакции в 2 раза превышает по-

глощение в контрольной пробе. В качестве контроля при тестировании BSMV использовали препарат вируса табачной мозаики, а также экстракт из листьев или семян здоровых растений.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jackson A.O., Braakke M.K. // *Virology*. 1973. V. 55. P. 483 - 494.
2. Lane L.C. // *Virology*. 1974. V. 58. P. 323, 333.
3. Agranovsky A.A., Dolja V.V., Gorbulev V.G., Kozlov Yu.V., Atabekov J.G. // *Virology*. 1981. V. 113. P. 174 - 187.
4. Agranovsky A.A., Dolja V.V., Atabekov J.G. // *Virology*. 1982. V. 119. P. 51 - 58.
5. Dolja V.V., Sokolova N.A., Tjulkina L.G., Atabekov J.G. // *Mol. Gen. Genet.* 1979. V. 175. P. 93 - 97.
6. Partridge J.E., Shannon L.M., Gumpf D.J., Colbaugh P. // *Nature*. 1974. V. 247. P. 391, 392.
7. Atabekov J.G., Novikov V.K., Kiselev N.A., Kaftanova A.S., Egorov A.M. // *Virology*. 1968. V. 36. P. 620 - 638.
8. Sprague G.F., McKinney H.H. // *Genetics*. 1966. V. 54. P. 1287 - 1296.
9. Eslick R.F. // *Plant Dis. Rep.* 1953. V. 37. P. 290, 291.
10. Chico A.W., Baker R.J. // *Can. J. Plant Sci.* 1978. V. 58. P. 331 - 340.
11. Hamilton R.I. // *Phytopathology*. 1965. V. 55. P. 798, 799.
12. Carrol T.W., Gossel P.L., Bachelor D.L. // *Phytopathology*. 1979. V. 69. P. 12 - 14.
13. Atabekov J.G., Dementyeva S.P., Schaskolskaya N.D., Sacharovskaya G.N. // *Virology*. 1968. V. 36. P. 601 - 612.
14. Lundsgaard T. // *Z. Pflanzenkrankh. Pflanzenchutz*. 1976. B. 83. S. 278 - 283.
15. Lister R.M., Wright S.E., Kloots J.M. // *Phytopathol. News*. 1978. V. 12. P. 198.
16. Ball E.M. // *Virology*. 1973. V. 55. P. 516 - 520.
17. Brlansky R.H., Derrick K.S. // *Phytopathology*. 1979. V. 69. P. 96 - 100.
18. Сухачева Е.А., Новиков В.К., Амбросова С.М. // *Биоорганическая химия*. 1994. Т. 20. С. 1060 - 1069.
19. Бойков С.В., Новиков В.К., Кафтanova А.С., Атабеков И.Г. Штаммы вирусов растений. Владивосток, 1977. С. 30 - 35.
20. Ерохина Т.Н., Амбросова С.М., Варицев Ю.А., Малюфеева Ю.С., Князева В.П., Кулявцев А.В. // *Биоорганическая химия*. 1993. Т. 19. С. 941 - 949.
21. Gugerli P., Fries P. // *J. Gen. Virology*. 1983. V. 64. P. 2471 - 2477.
22. Hill E.K., Hill J.H., Durand D.P. // *J. Gen. Virology*. 1984. V. 65. P. 525 - 532.
23. Sherwood J.L., Sanborn M.R., Keyser G.C. // *Phytopathology*. 1987. V. 77. P. 1158 - 1161.
24. Martin R.R., Stace-Smith R. // *Can J. Plant Pathol.* 1984. V. 6. P. 206 - 210.
25. Plaksin D.Yu., Gromakovska E.T. // *J. NIH Res.* 1994. V. 6. P. 47.

26. Плечко Т.Н., Кириллов А.В., Амбросова С.М., Борисова О.В., Одынец А.Г. // Биоорганич. химия. 1991. Т. 17. С. 223 - 231.
27. Киселев Н.А., Атабеков И.Г., Кафтанова А.С., Новиков В.К. // Биохимия. 1966. Т. 31. Вып. 4. С. 670 - 678.
28. Nakane P.K. // Immunoassays: Clinical Laboratory Techniques for the 1980s / Eds R.M. Nakamura, W.R. Dito, E.S. Toker III. N.Y.: Alan R. Liss, Inc., 1980. P. 157 - 169.
29. Лукин Ю.В., Бахарев В.Н., Заиченко А.С., Воронов С.А., Зубов В.П., Грицкова И.А., Праведников А.Н. // Докл. АН СССР. 1985. Т. 285. С. 159 - 161.
30. Tijssen P., Kurstak E. // Anal. Biochem. 1984. V. 136. P. 451 - 457.

## An Enzyme Immunoassay System Based on Monoclonal Antibodies for Determination of Barley Stripe Mosaic Virus

E. A. Sukhacheva\*,<sup>1</sup> V. K. Novikov\*\*, D. Yu. Plaksin\*\*\*, and I. S. Pavlova\*

\* *Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya, 16/10, Moscow, 117871 Russia*

\*\* *Moscow State University, Biological Faculty, Department of Virology, Moscow, 119899 Russia*

\*\*\* *Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Ural Division, Perm, Russia*

**Abstract** – An enzyme immunoassay for barley stripe mosaic virus was developed based on a previously obtained set of monoclonal antibodies to the virus. It is suitable for the virus detection in a purified virus preparation or in extracts from leaves and seeds of the infected plants. Different variants of direct sandwich EIA and a system using the biotin conjugated antibodies and streptavidin-horseradish peroxidase conjugate were compared; the virus detection sensitivities were 26 and 13 - 14 ng/ml, respectively. Use of a conjugate of streptavidin and a homopolymer of horseradish peroxidase gave the virus detection sensitivity of 4 ng/ml.

*Key words: barley stripe mosaic virus, monoclonal antibodies, enzyme immunoassay system.*

<sup>1</sup> To whom correspondence should be addressed.