

МЕТОД ОТРИМАННЯ ПРЕПАРАТІВ М-ВІРУСУ КАРТОПЛІ ДЛЯ ВИРОБНИЦТВА ДІАГНОСТИЧНОЇ СИРОВАТКИ

Мамчур О.Є., Дмитрук О.О., Коломієць Л.П.

Інститут сільськогосподарської мікробіології УААН
вул. Шевченка, 97, м. Чернігів, Україна, 14027

Пропонується метод отримання препаратів М-вірусу картоплі, який передбачає поєднання освітлення рослинних екстрактів тритоном Х-100 з наступним осадженням вірусу поліетиленгліколем та очищенням шляхом препаративного електрофорезу в 40 %-ному забуференому розчині сахарози на сконструйованому нами приладі. Метод забезпечує отримання чистих препаратів з високим виходом вірусу. Результати добре відтворюються, що є важливим при виробництві імунодіагностикумів.

Ключові слова: М-вірус картоплі, чисті препарати вірусу, методи, препаративний електрофорез.

М-вірус картоплі (МВК) є одним з найбільш розповсюджених патогенів картоплі в усіх зонах вирощування культури. На Поліссі України спричинювані ним втрати врожаю становлять в середньому 40,8 % [1]. МВК превалює у посівах в моноінфекції чи в комплексі з іншими мозаїчними вірусами (64 % обстежених зразків) при ступені ураженості сортозразка 5-100 % [2]. Контроль насінневого матеріалу показує, що у відкритий ґрунт висаджується здоровий пробірковий матеріал, який у процесі подальшого розмноження зазнає реінфекції: ураженість клонового матеріалу становить 13-57 % залежно від імунологічних характеристик сорту, досягаючи 100 % на окремих сортах.

При аналізі відібраного в полі матеріалу виявляється латентна інфекція в 20-70 % зразків, що вказує на необхідність використання імунологічних методів діагностики вірусу для отримання об'єктивної інформації щодо якості матеріалу в насінницькій, селекційній роботі, ефективності захисних заходів, при вивченні циркуляції вірусу в природних умовах. Біологічні особливості МВК дають можливість виявляти його у вегетуючих рослинах методом крапельної аглютинації [3] при чутливості методу 1-100 мкг/мл, а також методом імуноферментного аналізу.

Контроль фітопатогенних вірусів потребує методичного забезпечення. Пошук нових методичних підходів при розробці і виробництві засобів діагностики з урахуванням особливостей патогенів спрямований на створення ефективних діагностикумів фітопатогенних вірусів.

У представленій роботі ми ставили за мету розробити метод отримання чистих препаратів МВК для виробництва діагностичної антисироватки.

Матеріали і методи. В роботі використовували колекційний штам М-вірусу картоплі [4] відділу фітовірусології та біотехнології Інституту с.-г. мікробіології УААН.

МВК накопичували на рослинах томатів сорту Перемога, які вирощували в умовах вегетаційної камери при 20 °С і фотоперіоді 16 годин. Заражали рослини в фазі 3-4 справжніх листків методом механічної інокуляції з попереднім опудруванням карборундом. Строк максимальної концентрації вірусу в рослинах томату – 21-25 днів після інокуляції.

При розробці методу очищення використовували відомі методики [5-8] та прилад для препаративного електрофорезу [9,10], сконструйований в нашому інституті.

Контроль етапів отримання чистих препаратів проводили з використанням реакції крапельної аглютинації [3] та електронної мікроскопії нативних препаратів, контрастованих 2%-ним розчином фосфорно-вольфрамової кислоти, рН 6,0. Досліджували препарати за допомогою електронного мікроскопа Tesla-540 при інструментальному збільшенні 22-30 тис.

Спектри поглинання УФ-світла препаратами МВК реєстрували на однопроменевому спектрофотометрі СФ-46.

Результати та їх обговорення. Для виділення препарату МВК листя томатів відбирали на 21-25-й день після зараження.

Проводили інфільтрацію в 0,3 М трис-гліциновому буферному розчині, рН 8,3 з додаванням 0,1 %-ного 2-меркаптоетанолу (МЕ) та 0,01М ЕДТА протягом 12 годин за температури +4 °С.

Попередня інфільтрація рослинного матеріалу сприяла підвищенню ефективності екстракції вірусу, блокуючи дію ферментів рослинного соку.

Після інфільтрації листя подрібнювали на вальцевому пресі ПВЛ-1 в присутності 0,3 М трис-гліцинового буфера, рН 8,3 у співвідношенні 1:2. Отриманий гомогенат віджимали через капронове сито. Екстракт в трис-гліциновому буферному розчині містив менше пігменту, ніж при використанні фосфатного чи цитратного буферних розчинів, що значно поліпшувало наступні етапи очистки.

Освітлювали екстракт шляхом центрифугування за 15 000 об/хв протягом 20 хв. До надосадової рідини додавали краплями 20 %-ний розчин тритон Х-100 до кінцевої концентрації 0,5 % та інкубували

30 хв., не застосовуючи на цьому етапі органічних розчинників, які різко знижують вихід вірусу [11, 12]. Додавання тритон-Х100 зумовлює розчинення клітинних мембран і хлоропластів перед осадженням поліетиленгліколем (ПЕГ).

Первинне концентрування вірусу проводили шляхом додавання до екстракту 20 %-ного розчину поліетиленгліколю (м.в. 40000) та NaCl до кінцевої концентрації 8 % та 1,5 %, відповідно. Витримували 1 годину при температурі +4 °С. Преципітат відділяли центрифугуванням за 6000 об/хв протягом 20 хв.

Після центрифугування при 6000 об/хв в надосадковій рідині вірус серологічно не виявлявся. Для повної екстракції вірусу необхідно було проводити декілька послідовних ресуспендувань осаду 0,01 М трис-гліциновим буфером, рН 8,3, кожен раз освітлюючи екстракт низькошвидкісним центрифугуванням. На цьому етапі загальний об'єм отриманого препарату вірусу не перевищував 1/10 від початкового об'єму рослинного екстракту.

Після осадження ПЕГ екстракція МВК із преципітата, який містить значну кількість білків рослини-хазяїна, ускладнена. Це потребує застосування ряду циклів екстракції вірусу із осадів та контролю на кожному етапі для уникнення значної втрати вірусу. Екстракція МВК з осадів проходить більш ефективно, якщо для гомогенізації рослинної тканини використовувати трис-гліциновий буфер, а не фосфатний чи цитратний. При використанні трис-гліцинового буфера основна кількість вірусу екстрагується при перших двох етапах ресуспендування.

Остаточне очищення препарату МВК здійснювали за допомогою приладу для препаративного електрофорезу із застосуванням 40%-ної сахарозної подушки.

При проведенні препаративного електрофорезу МВК необхідно було підібрати оптимальні умови для очищення вірусу: рН та йонну силу буферних розчинів, температурний режим, напругу електричного поля, тривалість, концентрацію сахарозної подушки, кількість антигену, який можна розділити [12].

Сконцентрований осадженням ПЕГ препарат вірусу нашаровували на 40%-у сахарозну подушку висотою 10 см та діаметром 1,5 см, яка була сформована в електрофоретичній колонці.

Електрофорез вели в лужній системі буферів за температури 16-20 °С, сили струму 8-10 мА та напрузі 380-400 в протягом 3 годин.

При відпрацюванні цього етапу отримання препарату МВК виявили, що електрофорез в 40 % сахарозі є ефективним прийомом для

концентрування МВК та очищення його від рослинних компонентів.

В роботі ми використовували 0,01М трис-гліциновий буфер, рН 8,3, який найбільше підходить як для екстракції МВК, так і для електрофорезу. Виходили з того, що буферний розчин, який використовується при електрофорезі, повинен мати низьку іонну силу (0,005-0,02), що дозволяє застосовувати високі градієнти напруги вздовж колонки при мінімальному утворенні тепла. Крім того, мають бути підібрані такі значення рН буферних розчинів, щоб різниця в зарядах між компонентами суміші, яка розділяється, була максимальною [7, 12].

Напругу поля належить підтримувати настільки високою, наскільки можливо за умов мінімального утворення та розсіювання тепла. При розробці нашого методу мінімальний нагрів і конвекцію спостерігали при силі струму 8-10 мА та напрузі 380-400 в.

Важливим фактором при препаративному електрофорезі в 40%-ній сахарозі є температура: якщо охолодження недостатнє, то це призводить до нерівномірного розподілу фракцій.

Експериментальним шляхом визначали тривалість електрофорезу препарату МВК. Після 1; 2; 3 годин електрофорезу зразки проби та сахарозної подушки перевіряли методами серології та електронної мікроскопії на наявність антигену. Встановлено, що після трьох годин електрофорезу вірус повністю осідав на поверхні пробки ПААГ.

Візуальне спостереження за перебігом електрофорезу показало, що через 30 хвилин після включення струму від зони проби починають відділятися пластівчасті утворення, які осідають на пробці ПААГ, формуючи ледве помітний шар. Вірогідно, це є агрегати МВК, які утворилися після осадження ПЕГ і можуть містити залишки клітинного дебрису. При застосуванні диференційного центрифугування сконцентрованого ПЕГ препарату віруси, які перебувають в агрегованому стані, неминуче втрачаються [5], внаслідок чого знижується загальний вихід вірусу. За розробленою нами методикою, агрегати МВК зберігаються саме завдяки відсутності проміжних циклів диференційного центрифугування.

Електрофоретична рухомість агрегатів у 40 %-ній сахарозі за створених нами умов є вищою за рухомість одиничних часток вірусу; можливо, швидкість міграції агрегатів вірусу збільшується за рахунок сили тяжіння.

Після проходження сахарозної подушки частки вірусу та агрегати утворюють шар на поверхні пробки 10 %-ного ПААГ, яка непроникна для МВК. Тому, залишаючись на поверхні гелю, антиген додатково піддається електродіалізу, завдяки чому відокремлюються низькомолекулярні

домішки рослинного походження. Крім того, під час електродіалізу збільшується розчинність агрегатів вірусу. МВК переходить у фізрозчин у вигляді препарату достатньо високого ступеня чистоти.

Після закінчення електрофорезу препарат вірусу змивали фізіологічним розчином з поверхні пробки 10 %-ного поліакріламідного гелю, яка відділяє робочий об'єм від нижнього електродного буфера. Верхній шар гелевої пробки діставали з електрофоретичної колонки, розтирали у фізрозчині, витримували 12 годин при температурі 4 °С та центрифугували із швидкістю 15000 об/хв. Надосадову рідину аналізували на присутність вірусу, об'єднували із змивом з поверхні ПААГ. Отриманий препарат використовували для проведення електронномікроскопічних та спектрофотометричних досліджень та як антиген для імунізації кролів.

Частина вірусу неминуче адсорбується на поверхні ПААГ, утворюючи нерозчинні комплекси за рахунок гідрофобних та ковалентних зв'язків, але наявність ПААГ в антигені може слугувати ад'ювантом при імунізації тварин, що підвищує титр антисироваток (8).

Препарати МВК, отримані за розробленим нами методом, як показало електронномікроскопічне дослідження, містили типові для даного вірусу одиничні частки, а також агрегати віріонів з переважанням агрегатів вірусу. Це, на наш погляд, пояснюється відсутністю циклів диференційного центрифугування, коли більшість агрегатів вірусу втрачається.

Очищені препарати М-вірусу картоплі характеризувалися типовим для карлавірусів спектром поглинання УФ-світла з мінімумом поглинання при 247 нм та максимумом – при 270 нм. Вихід вірусу становив 500 мг/кг листя.

Таким чином, поєднання освітлення рослинних екстрактів три-тоном Х-100 з наступним осадженням вірусу за допомогою поліетиленгліколю та очищення з використанням препаративного електрофорезом в 40 %-ному розчині сахарози дало можливість отримати чисті препарати МВК. При цьому ми змогли скоротити необхідні об'єми вирощування рослин-накопичувачів вірусів та відмовитися від використання ультрацентрифуг для очищення вірусного антигену. Препарати МВК, отримані за розробленим нами методом, характеризуються високим ступенем чистоти та підвищеним виходом вірусу, що робить метод придатним для виготовлення антигену МВК та отримання специфічних антисироваток. Результати добре відтворюються, що є важливим при виробництві імунодіагностикумів.

1. Ситченко І.Р., Марков І.Л. Шкідливість і поширення вірусу М на картоплі в Поліській зоні УРСР // Картоплярство. – 1980. – Вип. 11. – С. 78-80.
2. Коломієць Л.П. Фітосанітарний стан агроєкосистем як фактор продуктивності сільськогосподарського виробництва // Лідер України. – 2005. – № 12. – С. 124-126.
3. Дунин М.С., Попова Н.М. Капельный метод анализа в растениеводстве. – М.: Сельхозгиз.- 1973.-45с.
4. Пат. 20194 Україна, МПК⁵ С 12 N 7/00, А 01 № 63/00. Штам М-вірусу картоплі для виробництва діагностичної сироватки / Коломієць Л.П., Козар Ф.Ю., Лебідь Л.М., Погорілько М.Я. // Заявл. 29.07.88; Опубл. 25.12.97, Бюл. – № 6
5. Новиков В.К., Атабеков И.Г., Агур М.О. и др. Метод получения препарата Y-вируса картофеля и приготовление диагностических антисывороток // Сельскохозяйственная биология. – 1982. – 17, № 5. – С. 706-711.
6. Van Regenmortel M.H.V. Purification of plant virus by zone electrophoresis // Virologi. – 1964. – № 23. – P. 495-503.
7. Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. Электрофорез и ультрацентрифугирование. – М. : Наука, 1981. – 274 с.
8. Мамчур О.Є., Дмитрук О.О., Волкова І.В., Зарицький М.М. Препаративний електрофорез ВСЛК в градієнті концентрації сахарози // Бюл. ІСГМ УААН. – 2000. – № 7. – С. 47.
9. Пат. 64377А Україна, МПК⁷ С 12 N 7/00. Пристрій для препаративного електрофорезу в гранульованому середовищі / О.Є. Мамчур, О.О. Дмитрук, М.М. Зарицький // Заявл. 22.05.2003; Опубл. 16.02.2004, Бюл. – № 2.
10. Prol E., Ahrens E., Richter J. Ein Beitrag zur Differenzierung von Isolaten des Kartoffel-virus M // Arch. Phytopathol. U Pflanzenschutz.- Berlin, 1978. – Vol. 14, № 4. – P. 209-217.
11. Tavantris S.M. Physiochemical properties of potato virus M // Virology.- 1984.-133.-P.427-430.
12. Электрофорез в разделении биологических макромолекул: Пер. с англ./ Под ред. В.И. Розенгарта. – М.: Мир, 1982. – 448 с.

МЕТОД ПОЛУЧЕНИЯ ПРЕПАРАТОВ М-ВИРУСА КАРТОФЕЛЯ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ СЫВОРОТКИ

Мамчур А.Е., Дмитрук О.А., Коломиец Л.П.

Институт сельскохозяйственной микробиологии УААН, г. Чернигов

Предлагается метод получения препаратов МВК, который предусматривает осветление растительных экстрактов тритоном X-100 с последующим осаждением вируса полиэтиленгликолем и препаративный электрофорез в 40 %-ной сахарозе на сконструированном в отделе приборе. Метод обеспечивает получение чистых препаратов с высоким выходом вируса. Результаты хорошо воспроизводятся, что имеет важное значение при производстве иммунодиагностикумов.

Ключевые слова: *М-вирус картофеля, чистые препараты вируса, методы, препаративный электрофорез.*

THE METHOD OF POTATO VIRUS M PREPARATIONS OBTAINING FOR DIAGNOSTICUMS PRODUCTION

Mamchur A.E., Dmitruk O.A., Kolomietz L.P.

Institute of Agricultural Microbiology, UAAS, Chernihiv

The method for the purified and concentrated PMV (potato virus M) preparations obtaining has been adapted. Purification of PMV included the plant sap settling by Triton X-100, virus precipitation by polyethilenglicol and preparative electrophoresis at 40 % succharose. The results are replaied well, here it is important for the immunodiagnosticumes production.

Key words: *potato virus M, purified virus preparation, methods, preparative electrophoresis.*