

ПОЛУЧЕНИЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ К ВИРУСУ ОГУРЕЧНОЙ МОЗАИКИ

Алиев М.Р.^{1,2}, Милованкин П.Г.³, Какарека Н.Н.¹, Смолина Т.П.³, Толкач В.Ф.¹,
Кузнецова Т.А.³, Волков В.Г.¹, Щелканов М.Ю.^{1,2,3}

¹Федеральный научный Центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии ДВО РАН,
Владивосток, Россия

²Дальневосточный федеральный университет, школа медицины и наук о жизни,
Владивосток, Россия

³НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова Роспотребнадзора, Владивосток,
Россия

Идентификация фитовирусов, изучение их экологии и эпифитотических характеристик, источников их проникновения в местные фитоценозы необходимы для разработки мероприятий по защите агроценозов от вирусных заболеваний, которые не только снижают урожайность экономически значимых сельскохозяйственных культур, но и изменяют потребительские свойства продукции растениеводства [1].

Вирус огуречной мозаики (ВОМ) (Martellivirales: Bromoviridae, *Cucumovirus*) – опасный фитопатоген, поражающий различные растения, включая важные сельскохозяйственные культуры. ВОМ имеет убиквитарное распространение, в том числе, широко распространён на Дальнем востоке, где, как установлено, поражает овощные, декоративные, плодово-ягодные, садовые и дикорастущие растения. В Приморском крае ВОМ впервые был идентифицирован в 1967 году. У растений, поражённых этим вирусом, формируются плоды неправильной формы значительно меньших размеров, а также разрушается хлорофилл, вследствие чего становится невозможным эффективный фотосинтез и синтез глюкозы [1]. Кроме прямого ущерба продуктивности растений ВОМ снижают устойчивость и к неблагоприятным условиям существования [2].

Для идентификации ВОМ используют метод индикаторных растений, позволяющий выявить патогенность штамма, серологические методы, подходящие для экспресс-выявления ВОМ в полевых условиях, полимеразную цепную реакцию с обратной транскрипцией и секвенирование нуклеиновых кислот для получения исчерпывающей информации о вирусном геноме. В настоящее время, известен ряд иммунологических и молекулярных методов диагностики фитовирусов с высоким уровнем чувствительности и специфичности, основанных на использовании иммуноферментного анализа (ИФА), полимеразной цепной реакции (ПЦР), иммунобиосенсоров, масс-спектрометрии, петлевой изотермической амплификации, геномного секвенирования [1, 3-5]. Однако разработка серологических методов индикации ВОМ на основе моноклональных антител, обеспечивающих повышение чувствительности диагностики и уровня стандартизации выпускаемых на их основе тест-систем, представляется актуальной задачей. К таким методам относятся преципитационные, иммуноферментные, иммунохроматографические, иммунобиосенсорные и иммуноблоттинг.

Цель настоящей работы – получение высокоспецифичных моноклональных антител против ВОМ.

В работе использовали изолят ВОМ-к/кор, полученный из коллекции ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН [6], клетки миеломной линии X63-Ag8.6.5.3, резистентной к 8-азагуанину (НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, РФ), мышей самцов линии BALB/c, массой 18-20 г, полный и неполный адьювант Фрейнда (Sigma-Aldrich, США).

С целью накопления вируса проводили заражение тыквы обыкновенной (*Cucurbita pepo*). Через три недели после инокуляции свежесорванные листья зараженного растения гомогенизировали в 0,1 М фосфатном буфере, pH 7,6, с добавлением 0,1 %-ной тиогликолевой кислоты в соотношении 1:1. Осветляли гомогенат добавлением хлороформа (1:5) либо смеси из хлороформа и 8 %-го бутанола (1:8), после чего подвергали низкоскоростному центрифугированию (6000 об/мин × 30 мин). Осаждали вирус

добавлением к супернатанту 8-10 % полиэтиленгликоля (ПЭГ) (4000-6000 г/моль) (Sigma-Aldrich, США) и NaCl до концентрации 0,2 М. Смесь инкубировали несколько часов при 4 °С. Центрифугировали при 15000 об/мин в течение 10-15 мин. Осадки ресуспендировали в 0,01 М фосфатном буфере, рН 7,6, и оставляли на ночь при температуре 4 °С. Центрифугировали при 10-12 тыс. об/мин в течение 10-15 мин. Осадки повторно ресуспендировали в том же буфере и еще раз центрифугировали. Супернатанты объединяли и концентрировали. Концентрирование вируса производили двумя циклами дифференциального центрифугирования (30 тыс. об/мин × 90 мин). В первом цикле пробирки уравнивали 0,005 М боратым буфером, рН 9,0, с добавлением 0.0005 М ЭДТА в присутствии 2 %-го Тритона X-100. Осадок ресуспендировали в том же буфере, но без Тритона X-100. Второй цикл центрифугирования проводили продавливанием через 1 М сахарозную подушку, приготовленную на 0,005 М боратном буфере, рН 9,0, с добавлением 0,1 %-ой тиогликолевой кислоты. Вирус экстрагировали в минимальном количестве 0,01 М фосфатного буфера, рН 7,6.

Мышей линии BALB/c иммунизировали внутримышечно суспензией ВОМ в концентрации 0,5 г/мл один раз в неделю в течение 3 недель по следующей схеме: 1-ая инъекция ВОМ с полным адьювантом Фрейнда в соотношении 1:1; 2-ая – ВОМ с неполным адьювантом Фрейнда в соотношении 1:1; 3-ья – ВОМ с неполным адьювантом Фрейнда. Последнюю иммунизацию производили за три дня до извлечения селезенки [7]. Иммунизация мышей по описанной выше схеме приводила к выработке антител в титрах $3,7 \pm 0,6 \log_2$, что свидетельствует об эффективности иммунизации и позволяет проводить процедуру гибридизации.

Селезенку гомогенизировали, спленоциты подвергали процедуре слияния с клетками миеломы X63-Ag8.6.5.3. Гибридизацию проводили в стеклянной круглодонной колбе путем медленного добавления ПЭГ молекулярной массой 3000-5000 г/моль (Sigma-Aldrich, США) в концентрации 50 % и вращением колбы вокруг своей оси на протяжении 5 мин. Реакцию останавливали постепенным добавлением бессывороточной среды DMEM (БиолоТ, РФ). Далее полученную смесь центрифугировали и смешивали со средой, содержащей 15 % эмбриональную телячью сыворотку, гипоксантин, аминоптерин, тимидин, и высевали на 96-луночный планшет для селекции в течение 2 недель. В планшет в качестве фидерных клеток добавляли макрофаги, полученные из брюшной полости здоровой мыши. Восстановление клеток миеломы X63-Ag8.6.5.3 для гибридизации продолжалось в течение 3 недель. Селезенки иммунных мышей подвергались процедуре слияния с клетками миеломы X63-Ag8.6.5.3. Видимые в инвертированном микроскопе колонии гибридомы появились через 10-14 дней.

Эффективность продукции антител проверяли методом радиальной иммунодиффузии на предметных стеклах. Клетки гибридом замораживали в неполной среде с добавлением диметилсульфоксида в холодном азоте для дальнейших исследований [8, 9]. Через 3 недели после гибридизации в реакции радиальной иммунодиффузии в агарозном геле в ряде лунок было зарегистрировано наличие моноклональных антител к ВОМ, продуцируемых гибридомой. В настоящее время, проводится исследование специфичности продуцируемых моноклональных антител.

Таким образом, иммунизация мышей линии BALB/c ВОМ с адьювантом Фрейнда индуцирует иммунный ответ, связанный с созреванием антителопродуцирующих клеток, которые могут использоваться для получения гибридомы, вырабатывающей целевой иммуноглобулин.

Литература

1. Щелканов МЮ, Какарека НН, Волков ЮГ, Толкач ВФ. Становление фитовирусологии на Дальнем Востоке в контексте развития отечественной вирусологии. Владивосток: Изд-во ДВФУ, 2022. 142 с.

2. Козловская ЗН, Романова СА, Леднева ВА и др. Биологические и физико-химические свойства изолятов вируса огуречной мозаики в странах Дальневосточного региона. *Сельскохозяйственная биология*. 2003;38:114-117.
3. Гнутова РВ, Толкач ВФ, Несмелов ИБ Идентификация, диагностика и филогенетический анализ вирусов овощных культур в агроценозах бассейна реки Амур (Хабаровский край). *Растительный мир Азиатской России*. 2014;(4):71-77.
4. Толкач ВФ, Какарека НН, Волков ЮГ. Вирусные болезни овощных и бахчевых сельскохозяйственных культур на юге Дальнего Востока. *Юг России: экология, развитие*. 2019;14(4):121-133.
5. Finch JT, Klug A, van Regenmortel MN. The structure of cucumber mosaic virus. *Journal of Molecular Biology*. 1967;11:309-319.
6. Щелканов МЮ, Волков ЮГ, Какарека НН и др. Организация Российской государственной коллекции вирусов Восточной Азии на базе ДВО РАН. В сб.: *Научные труды международных научных чтений «Приморские Зори 2017»* (Владивосток, Россия; 20-22 апреля 2017 г.). Владивосток: Изд-во ДВФУ, 2017. 466-470.
7. Zhang N, Channappanavar R, Ma C, et al. Identification of an ideal adjuvant for receptor-binding domain-based subunit vaccines against Middle East respiratory syndrome coronavirus. *Cellular and Molecular Immunology*. 2016;13:180-190.
8. Свиридов ВВ, Волгарева ГМ, Зайцев ЕМ и др. Методические рекомендации по получению гибридом-продуцентов моноклиальных антител к бактериальным антигенам. М: НИИВС им. И.И. Мечникова, 1986. 37 с.
9. Shang, H., Xie, Y., Zhou, X. et al. Monoclonal antibody-based serological methods for detection of Cucumber green mottle mosaic virus. *Virology* 2011; № 8, P. 228 <https://doi.org/10.1186/1743-422X-8-228>.