

Спосіб імуноферментного виявлення вірусів у рослинному матеріалі (корисна модель) відноситься до біології (фітовірусології і біотехнології) та сільського господарства, може бути використаний для виявлення фітопатогенних вірусів у рослинному матеріалі.

Для діагностики фітопатогенних вірусів широко використовують різні способи проведення імуноферментного аналізу з сенсibilізацією твердої фази антитілами чи антигенами [Антитела. Методы.: Под ред. Д. Кэтті. - М.: Мир, 1991. - Т.2. - 384с, Clark M. F., Adams A.N. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of the plant viruses // J. Gen. Virol. - 1977. - 34. - P. 475-483].

За всіма способами імуноферментного визначення фітопатогенних вірусів першим етапом є зв'язування специфічних антитіл чи антигенів з твердофазним носієм, в якості якого можуть слугувати полімерні матеріали, здатні адсорбувати білки, у вигляді панелей, планшетів, пробірок, кювет, стержнів, гранул, плівок та ін. [Clark M.F., Adams A.N. Characteristics of the micro-plate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses//J. Gen. Virol. - 1977.- V.34.- P. 475-483; Егоров А.М., Осипов А.П., Дзантиев Б.Б. и др. Теория и практика иммуноферментного анализа. - М.: Высшая школа, 1991.- 288с.].

Найбільш поширеним у практиці є спосіб імуноферментного виявлення вірусів рослин з проведенням реакцій на мікроплатах з 96 лунками із оптично прозорого полістиролу [Инструкция по использованию иммуноферментного диагностического набора для определения вирусов картофеля. - НПО по картофелеводству, Коренево, 1991. - 6с.], що може бути прототипом.

За такого способу імуноферментного виявлення вірусів рослин для дозування реакційних розчинів в лунки мікроплати застосовують піпетки, дозатори, мікронасоси; для відмивання твердофазних носіїв після видалення реагентів з лунок застосовують пристрої різноманітних конструкцій з резервуарами, які містять промивочний розчин; для забезпечення оптимального режиму проходження реакцій використовують термостати. Результати якісного ТІФА оцінюють візуально.

Недоліком способів імуноферментного виявлення вірусів рослин з проведенням реакцій на мікроплатах з 96 лунками із оптично прозорого полістиролу є необхідність використання спеціального обладнання та приладів, тобто можливість аналізу лише в умовах вірусологічних лабораторій.

Спосіб імуноферментного виявлення вірусів рослин, що пропонується, вирішує задачу спрощення та полегшення процедури постановки реакції ТІФА, включаючи можливість проведення аналізу в польових умовах, шляхом використання ін'єкційного шприца в якості ємності для твердофазного носія, промивочного та дозаторного пристроїв одночасно. Для забезпечення оптимального температурного режиму реакції за рахунок температури тіла людини, яка проводить аналіз, можна покласти шприц в кишеню або потримати в руці.

Спосіб імуноферментного виявлення вірусів рослин, що пропонується, включає розміщення сенсibilізованого вірусоспецифічними антитілами твердофазного носія (висічки з полістиролу) в порожнині шприца під поршнем, послідовне внесення в порожнину шприца (за рахунок заповнення та видалення розчинів з порожнини шприца осьовим переміщенням поршня) рослинного соку, пероксидазного кон'югату, ортофенілєндіаміну, з проміжними промивками буфером, візуальну оцінку результату за зміною забарвлення реагентів.

Спосіб імуноферментного виявлення вірусів рослин, що пропонується, виконується таким чином:

Сенсibilізований вірусоспецифічними антитілами твердофазний носій (висічки з полістиролу) поміщають в порожнину шприца під поршень.

Висічки з полістиролу (твердофазний носій) сенсibilізують, занурюючи у розчин специфічних антитіл у робочому розведенні в 0,05 М карбонатному буферному розчині, рН 9,5 на 16-18 годин при температурі 4°C або протягом 2 годин при температурі 37°C. Після чого триразово промивають фізіологічним розчином з додаванням детергенту Tween-20 (0.5мл/л).

Ця процедура може проводитись як безпосередньо у порожнині шприца, так і завчасно: сенсibilізовані висічки можна також висушити при кімнатній температурі та у висушеному стані зберігати до 2-х місяців.

Осьове переміщення поршня дає можливість заповнення та видалення розчинів з порожнини шприца. Корпус шприца має шкалу, яка дозволяє відмірювати задані об'єми проб та буферів. Оптична прозорість корпусу достатня для спостереження за зміною забарвлення при проведенні ТІФА.

За рахунок заповнення та видалення розчинів з порожнини шприца осьовим переміщенням поршня послідовно здійснюються етапи імуноферментної реакції ("сендвич" - варіант): зв'язування специфічних поліклональних антитіл, адсорбованих на розташованому під поршнем твердофазному носії, з соком рослин протягом 60хв.; внесення мічених пероксидазою хрому антитіл (кон'югату) на 60хв.; проведення ферментативної реакції (внесення субстрату); візуальна оцінка результату за зміною забарвлення розчину порівняно з негативним та позитивним контролем.

Температурний режим протікання реакції становить 28-37°C. Для забезпечення оптимального температурного режиму протягом інкубації достатньо привести шприц в контакт з тілом людини (можна покласти шприц в кишеню або потримати в руці).

Ефективність способу імуноферментного виявлення вірусів рослин, що пропонується, підтверджується наступними прикладами.

Приклад 1. Виявлення вірусу аукуба мозаїки картоплі (ВАМК) в рослинах картоплі.

Висічки з полістиролу сенсibilізували специфічними кролячими антитілами в 0,05 М карбонатному буферному розчині, рН 9,5 протягом 16-18 годин при температурі 4°C. Промивали фізіологічним розчином з додаванням детергенту Tween-20.

Сенсibilізовані висічки розташовували в шприцах під поршнем.

Негативним контролем слугував сік здорових рослин картоплі, позитивним - сік листків рослин картоплі сорту Обелікс, уражених ВАМК.

З тестованих рослин віджимали сік, набирали його по 0,02мл в шприци та додатково набирали по 0,1мл 0,01М натрій-калій-фосфатного буферу, рН 7,4. Шприц витримували у внутрішній кишені протягом 60хв.

Промивали тричі фізрозчином та дистильованою водою.

Потім у шприц набирали 0,1мл кон'югату в робочому розведенні та інкубували 6 хв.

Після відмивання вносили по 0,1мл розчину субстрату (ОФД). Через 10-20 хвилин спостерігали розвиток рівня забарвлення розчину в шприцах порівняно з позитивним та негативним.

Приклад 2. Тестування рослин картоплі на присутність Х-вірусу картоплі (ХВК).

Твердофазний носій з полістиролу розміщували в шприці під поршнем, набирали по 0,1мл робочого розчину специфічних до ХВК антитіл в 0,05М карбонатному буферному розчині, рН 9,5 та витримували 2 години при температурі 37°C.

Після триразового промивання фізрозчином з детергентом вносили по 0,02мл соку рослин та по 0,1мл буферу для проб.

Негативним контролем слугував сік здорових рослин дурману (*Datura stramonium* L.), позитивним - сік ураженого ХВК дурману.

Після інкубації з тестованим соком та промивання фізрозчином послідовно додавали пероксидазний кон'югат та субстрат (ОФД). Після 10 хвилин інкубації з субстратом візуально спостерігали ферментативну реакцію та враховували результати.

Таким чином, запропонований спосіб імуноферментного виявлення фітопатогених вірусів простіше у виконанні та дешевше порівняно з іншими способами твердофазного ІФА, а також, дозволяє проводити аналіз в польових умовах.