



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **59997** (13) **U**
(51) МПК (2011.01)
G01N 33/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ВИГОТОВЛЕННЯ АНТИСИРОВАТКИ ДО ЛІПОПОЛІСАХАРИДІВ ЗБУДНИКА БУРОЇ БАКТЕРІАЛЬНОЇ ГНИЛІ КАРТОПЛІ

1

2

(21) u201013163

(22) 05.11.2010

(24) 10.06.2011

(46) 10.06.2011, Бюл.№ 11, 2011 р.

(72) ГОЛИК ІВАН ВАСИЛЬОВИЧ, МЕЛЬНИК ПАВЛО ОЛЕКСІЙОВИЧ, КУШНІР ЛЕОНІД ДМИТРОВИЧ, ГЕРАСИМ ГЕОРГІЙ МИКОЛАЙОВИЧ

(73) УКРАЇНСЬКА НАУКОВО-ДОСЛІДНА СТАНЦІЯ КАРАНТИНУ РОСЛИН

(57) Спосіб виготовлення антисироватки до ліпополісахаридів (ЛПС) збудника бурої бактеріальної

гнилі картоплі *Ralstonia solanacearum*, що включає використання трьох ін'єкцій в процесі імунізації тварин та однієї - в період їх реімунізації, який **відрізняється** тим, що в процесі імунізації тварин інтервали між ін'єкціями збільшуються до 9 діб, а реімунізацію проводять через 25 діб після третьої ін'єкції, в організм тварин вводять преципітат, який одержують в результаті реакції ЛПС з гомологічною антисироваткою.

Корисна модель відноситься до області імунології, зокрема до технології виготовлення антисироватки до ліпополісахаридів (ЛПС) збудника бурої бактеріальної гнилі картоплі *Ralstonia solanacearum* і може бути використаний для вивчення видових та внутрішньовидових форм патогена.

В літературі відомо багато способів імунізації тварин. Вони відпрацьовані відповідно їх призначенням і відрізняються між собою по складності циклу ін'єкцій, особливості антигенів та іншим показникам. Наприклад, для визначення міцелія стеблової іржі в рослині пшениці антисироватку готують за допомогою схеми, цикл якої складається з трьох ін'єкцій з інтервалом 14 діб [1], а для діагностики туберкульозу антисироватку одержують в результаті 3-5 ін'єкцій з інтервалом в 7 діб [2]. Для вивчення імунологічних особливостей білків картоплі підходить антисироватка, яку створюють в процесі трьох ін'єкцій з інтервалом в 7 діб і однієї ін'єкції, яку проводять в якості реімунізації через місяць після третьої [3]. Для вивчення вірусу шарки сливи відпрацьована в процесі імунізації антисироватка, яку одержують за допомогою циклу з трьох ін'єкцій при імунізації і двох ін'єкцій в період реімунізації [4].

Із наведених аналогів найбільш близьким до нашого винаходу являється спосіб виготовлення антисироватки до білків картоплі (прототип). Він характеризується тим, що повний цикл імунізації тварин складається з трьох внутрішньом'язових

ін'єкцій і однієї реімунізації через місяць після останньої ін'єкції [3].

Недоліком цього способу є те, що він не може бути використаний для одержання антисироватки до ЛПС збудника бурої бактеріальної гнилі картоплі в зв'язку з тим, що цей антиген, як показали наші дослідження, відрізняється по імуногенності від білків картоплі. Реакція імунованих тварин щодо створення антитіл на введення в їх організм ЛПС патогена і білків рослини-живителя відрізняється в часі.

Мета - розробити спосіб виготовлення антисироватки до ліпополісахаридів збудника бурої бактеріальної гнилі картоплі.

Мета досягається в результаті збільшення на дві доби інтервалів між ін'єкціями при імунізації тварин та зменшення на п'ять діб проведення реімунізації, а також за рахунок використання при ін'єкціях преципітату, одержаного в процесі реакції ЛПС патогена з гомологічною антисироваткою.

Приклад конкретного використання

Перш ніж розпочати процес виготовлення антисироватки до ЛПС збудника бурої бактеріальної гнилі картоплі здійснюють роботу по репродукції бактерій патогена і виділенню із них ЛПС. Бактерії патогена одержують шляхом вирощування їх на картопляному агарі (відвар 300 г картоплі в 1 л проточної води, в якому розчиняють 30 г агару). ЛПС виділяють з дводенних бактерій патогена за допомогою застосування відповідної методики [5].

(13) **U**
(11) **59997**
(19) **UA**

Одержаний розчин ЛПС зберігають в холодильнику при температурі 2-5°C до початку використання.

Антисироватку до ЛПС патогена створюють в організмах кроликів віком від 0.5 до 1 року, які пройшли процедуру відбору і показали в результаті обстеження свою придатність до імунізації, тобто ці тварини являються цілком здоровими і в їх крові відсутні антитіла до ЛПС патогена.

Дослідні тварини імунізують ЛПС з використанням неповного ад'юванта Фрейнда (НАФ) та преципітату. Преципітат одержують в процесі реакції коагпреципітації ЛПС із гомологічною антисироваткою. Останню можна замінити антисироваткою, одержаною до бактерій патогена.

Імунізацію тварин проводять по схемі, повний цикл якої складається з трьох ін'єкцій, які здійснюють в період імунізації і четвертої ін'єкції, яку здійснюють в період реімунізації. Три перші ін'єкції здійснюють з інтервалом в 9 діб, а четверту - через 25 діб після третьої. При кожній із трьох перших ін'єкцій кроликам вводять 1мг ЛПС, 1мл НАФ і 1мл преципітату на 1кг ваги тварини. Всі компоненти перед використанням старанно перемішують. Четверта ін'єкція складається з 2мг ЛПС, 1,5мл НАФ і 1,5мл преципітату і проводиться вона через 25 діб після третьої ін'єкції. При цьому кожну ін'єкцію проводять шляхом введення частини препарату підшкірно, а частину - внутрішньом'язово. За весь цикл імунізації в організм тварини вводять 5мг ЛПС на 1кг ваги.

На 9 день після четвертої ін'єкції визначають вміст антитіл в пробах крові і при наявності антитіл в достатній для проведення реакції кількості, здійснюють забір крові через розріз сонної артерії. Одержану кров спочатку ставлять на 2 години в термостат при 37°C, а потім помішають в холодильник при температурі 2-5°C і зберігають при цих умовах протягом доби для відділення антисироватки від формених елементів крові. Одержану антисироватку відділяють від сформованого згустка крові шляхом зливання або відсмоктування спеці-

альною піпеткою. Очищену від формених елементів антисироватку піддають консервації. Для цього в 100мл антисироватки розчиняють 3г суміші борної кислоти і сульфату натрію в пропорції 10:1 відповідно. В законсервованому стані антисироватку зберігають в холодильнику при температурі 2-5°C до початку досліджень. Перед використанням антисироватку можна очистити від консервантів шляхом діаліза її в кількості 5-10мл проти 3л дистильованої води протягом 2 годин.

Запропонований нами спосіб забезпечує виготовлення антисироватки, необхідної для імунологічного вивчення збудника бурої бактеріальної гнилі картоплі та ідентифікації його видових і внутрішньовидових форм.

Джерела інформації:

1. Щербакова Л.А., Умнов А.М., Найденова В.Н., Имуноферментный метод определения мицелия возбудителя стеблевой ржавчины в растениях пшеницы. Прикладная биохимия и микробиология том XXIV, выпуск 1, «Наука», 1988, с.114-120.
2. Лониц Л.І., Кисельов Є.М. Розробка латексного антигенного діагностикуму для серологічного визначення туберкульозної інфекції. Мікробіологічний журнал, том 59, випуск 1, 1997, с.60-64.
3. Суриков И.М., Гаврилюк И.П., Оглуздин А.С., Цилосани Г.М. Иммунохимическое и электрофоретическое изучение белков каллусной и клубневой ткани регенератов картофеля. Физиология растений том 29, выпуск 4, 1982, с.758-761.
4. Ратушняк Л.К. Поширення та діагностика вірусу шарки сливи на півдні України. Автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук, Київ, 2004.
5. Paul Drigues, Andre Trigalet, Patrice Dupin, Daniel Samain. Comparative Studies of Lipopolysaccharide and exopolysaccharide from a virulent Strain of Pseudomonas Solanacearum and from Three Avirulent Mutants. -journal of Bacteriology, vol. 162, № 2. - May. 1985.