



УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **80599**

(13) **U**

(51) МПК

**C12N 7/02** (2006.01)

**A61K 35/76** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ**

(21) Номер заявки: **u 2012 12503**

(22) Дата подання заявки: **02.11.2012**

(24) Дата, з якої є чинними  
права на корисну  
модель: **10.06.2013**

(46) Публікація відомостей  
про видачу патенту: **10.06.2013, Бюл.№ 11**

(72) Винахідник(и):

**Дмитрук Оксана Олександрівна (UA),  
Мамчур Олександр Єгорович (UA),  
Коломієць Людмила Петрівна (UA),  
Бова Тетяна Олександрівна (UA)**

(73) Власник(и):

**ІНСТИТУТ СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКОЇ  
МІКРОБІОЛОГІЇ ТА  
АГРОПРОМИСЛОВОГО ВИРОБНИЦТВА  
НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ АГРАРНИХ  
НАУК УКРАЇНИ,  
вул. Шевченка, 97, м. Чернігів, Чернігівська  
обл., 14027 (UA)**

**(54) СПОСІБ ОТРИМАННЯ ДІАГНОСТИЧНИХ СИРОВАТОК ДО ФІТОПАТОГЕННИХ ВІРУСІВ**

(57) Реферат:

Спосіб отримання діагностичних сироваток до фітопатогенних вірусів включає отримання очищених вірусних препаратів, імунізацію кролів антигеном, визначення якості отриманих діагностичних антисироваток.

**UA 80599 U**



Спосіб отримання діагностичних сироваток до фітопатогенних вірусів належить до біології (фітовірусології та біотехнології) і сільського господарства й може бути використаний при виробництві специфічних антисироваток.

Створення методів та засобів імунодіагностики для виявлення економічно значимих фітопатогенних вірусів у рослинному матеріалі вимагає отримання вірусоспецифічних діагностичних антисироваток.

Відомо, що при виробництві діагностичних сироваток використовують антигенні властивості протеїнів оболонки вірусів, що спричиняє за ін'єкції у кров'яне русло тварин утворення специфічних антитіл. Виготовлення вірусоспецифічних діагностичних антисироваток з високою концентрацією антитіл можливо на основі сконцентрованих вірусних антигенів, які характеризуються високим ступенем чистоти. Поряд з цим, важливо враховувати імунологічну реактивність тварин, які використовуються для імунізації. У фітовірусології антивірусні сироватки найчастіше отримують при імунізації кролів, які реагують утворенням преципітуючих антитіл на введення антигенів різної природи [Мэтьюз Р. Вирусы растений: Пер. с англ. - М.: Мир, 1973.-592 с.; Гнутова Р.В. Иммунологические исследования в фитовирусологии / Р.В. Гнутова. - М.: Наука, 1985. - С. 147-153].

Сьогодні використовуються різні способи отримання діагностичних сироваток, які характеризуються основними етапами: виготовлення очищеного та сконцентрованого антигену, що дає змогу отримати моноспецифічні сироватки, підбір оптимальних доз імуногену, схеми імунізації (спосіб введення антигену, кількість ін'єкцій, інтервали між ін'єкціями, відбір крові), використання ад'ювантів, оцінка якості антисироваток.

Найбільш поширеним у практиці виробництва антисироватки є використання відомої схеми імунізації кролів (трьохкратні ін'єкції з інтервалом 7 днів) з ад'ювантом Фрейнда (повного і неповного) [Радкович Е.В., Гуца Г.Н., Филонова И.В. Изучение различных схем иммунизации лабораторных животных для получения специфических антисывороток к вирусам картофеля // Картофелеводство: сб. науч. тр. РУП "Науч.-практ. центр НАН Беларуси по картофелеводству" - Минск, 2008. - Т. 14. - С. 409-416; Гнутова Р.В. Иммунологические исследования в фитовирусологии. - М.: Наука, 1985. - С. 147-153], на основі вірусних препаратів, очищених за відомими методиками [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; Дашкевич В.К., Радкович Е.В., Гуца Г.Н. Оптимизация методики проведения иммуноферментного анализа на основе реагентов собственного производства по определению вирусов картофеля // Матер. Междунар. Конф. (Самохваловими, 9-12 авг. 2005) "Актуальные проблемы защиты картофеля, плодовых и овощных культур от болезней, вредителей и сорняков". Минск, 2005. - С. 54-60], що може бути прототипом.

Недоліком відомих способів отримання діагностичних сироваток є те, що період інтенсивного росту рослин-індикаторів і строки максимальної концентрації накопичення вірусів в умовах вегетаційної кімнати не завжди співпадають з оптимальними строками імунізації кролів. Тому виготовлені очищені препарати вірусів потребують таких способів зберігання, які забезпечують підтримання імуногенних властивостей вірусів упродовж певного часу.

Існують традиційні способи зберігання вірусних препаратів за температури нижче -20 °С, у рідкому азоті при від -70 до -196 °С або у ліофілізованому стані, що забезпечує збереженість вірусних антигенів упродовж року і більше [De Wijs J.J., Suda-Bachmann F. The long-term preservation of potato virus Y and water-melon mosaic virus in liquid nitrogen in comparison to other preservation methods / De Wijs J.J., Suda-Bachmann F. // Nethrl.J. Plant Pathol.-1979. - Vol. 85, №1. - P. 23-29; Purcifull D.E., Christie S.R., Batchelor D.L. Preservation of plant virus antigens by freeze-drying/ Purcifull D.E., Christie S.R., Batchelor D.L. // Phytopathology.-1975. -Vol. 65, № 11. - P. 1202-1205]. Але деякі віруси при заморожуванні піддаються деструкції, втрачають імуногенні властивості, а тому необхідно зберігати їх іншими способами. Консервування очищених вірусних препаратів сахарозою або гліцерином дозволяє зберігати їх імуногенні властивості упродовж кількох тижнів при температурі від +8 до +10 °С. Застосування 33 %-го сульфату амонію є ефективним при тривалому збереженні низки очищених вірусних препаратів (Х-, Y-, М-вірусів картоплі, вірус аукуба мозаїки картоплі), але перед використанням препарати необхідно звільнити від солі, що супроводжується неминучими втратами антигену.

Спосіб отримання діагностичних сироваток, що пропонується, включає іммобілізацію очищених вірусних препаратів (з визначеною концентрацією вірусу) в поліакриламідний гель (ПААГ), імунізацію кролів іммобілізованим антигеном (триразові ін'єкції з інтервалом 7 днів), визначення якості отриманих діагностичних антисироваток. ПААГ отримують шляхом полімеризації акриламиду та N,N-метилен-біс-акриламиду, ініціатор реакції - персульфат амонію,

промотор Ініціатора - N,N,N,N-тетраметилетилендіамін (ТЕМЕД). Використовують 30 % розчин мономерів з концентрацією метилен-біс-акриламід 2,7 % та 2,5 % розчин персульфату амонію. Очищені та концентровані препарати фітопатогенних вірусів з концентрацією 2-4 мг/см<sup>3</sup> вносять у розчин мономерів ПААГ, що дозволяє зберігати їх протягом 6-ти місяців при кімнатній температурі і використовувати як антиген для імунізації кролів.

Для приготування антигену гель розтирають у фарфоровій ступці з фізіологічним розчином (1:1, об'єм / об'єм) і центрифугують при 1000 g протягом 15 хв. Отриманий надосад використовують як антиген, де ПААГ виконує функцію ад'юванту.

Специфічну антисироватку виготовляють за схемою, яка передбачає три ін'єкції по 0,5 см<sup>3</sup> антигену з чергуванням підшкірних та внутрішньошкірних введень з інтервалом 7 днів. Через тиждень після останньої імунізації тричі відбирають кров з крайової вушної вени і визначають специфічність та титр антисироватки.

Отже, даний спосіб дозволяє отримати високоактивні та високоспецифічні сироватки до фітопатогенних вірусів завдяки іммобілізації вірусного антигену в масу полімерного носія, що продовжує термін зберігання вірусного препарату до 6 місяців та посилює імуностимуляцію тварин-продуцентів.

Спосіб отримання діагностичних сироваток, що пропонується, підтверджується наступними прикладами.

Приклад 1. Отримання діагностичної сироватки до вірусу аукуба мозаїки картоплі (ВАМК).

Використовували штам ВАМК-об вірусу аукуба мозаїки картоплі, виділений з рослин картоплі сорту Обелікс в агроценозах Північного Полісся України, який зберігається в колекції фітопатогенних вірусів Інституту сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН.

При очищенні та концентруванні ВАМК використовували відомі методики [Сапоцкий М.В. Выделение F-вируса картофеля и некоторые свойства его структурного белка // Вирусные болезни растений и меры борьбы с ними. - Владивосток, 1980. - С. 50-58; Метод отримання очищених препаратів вірусів рослин / Мамчур О.Є., Дмитрук О.О., Коломієць Л.П., Зарицький М.М. // Сільськогосподарська мікробіологія. - Чернігів, ЦНТЕІ, 2005. - С. 165-170] та методику препаративного електрофорезу [Пат. 64377 А Україна, МПК С12N7/00. Пристрій для препаративного електрофорезу в гранульованому середовищі / О.Є. Мамчур, О.О. Дмитрук, М.М. Зарицький; заявник і патентовласник Інститут сільськогосподарської мікробіології УААН - № 2003054637; заявл. 22.05.2003; опубл. 16.02.2004, Бюл. - № 2]. Отримували чисті препарати ВАМК з високим ступенем чистоти (співвідношення  $D_{260/280}=1,1$ ) та концентрацією вірусу 4 мг/см<sup>3</sup>. За допомогою електронної мікроскопії в очищених препаратах спостерігали ниткоподібні частки вірусу, модальна довжина яких становила  $590\pm 2$  нм, що відповідає характеристикам ВАМК.

Для іммобілізації вірусних часток використовували 10 % ПААГ, який має оптимальні механічні та адсорбційні властивості. До 30 % водного розчину мономерів об'ємом 4 см<sup>3</sup> додавали при інтенсивному перемішуванні за допомогою магнітної мішалки 8 см<sup>3</sup> очищеного вірусного антигену, 0,3 см<sup>3</sup> 2,5 % персульфату амонію та 3 краплі ТЕМЕД. Реакційну суміш розливали у скляні флакони по 2 см<sup>3</sup> і витримували протягом 15-20 хв для завершення процесу іммобілізації. Після полімеризації гелю флакони закупорювали і зберігали протягом 6-ти місяців при кімнатній температурі.

Під час приготування антигену моноліт гелю ретельно розтирали у фарфоровій ступці, ресуспендували фізіологічним розчином (1:1, об'єм/об'єм) і центрифугували при 1000 g протягом 15 хв. Отриманий супернатант використовували як антиген, де ПААГ виконував функцію ад'юванту.

Специфічну антисироватку отримували за схемою, яка передбачала три ін'єкції по 0,5 см<sup>3</sup> антигену з чергуванням підшкірних та внутрішньошкірних введень з інтервалом 7 днів. Через тиждень після останньої імунізації тричі відбирали кров з крайової вушної вени та визначали специфічність і титр антисироватки. Діагностична сироватка давала реакцію крапельної аглютинації з інфікованим ВАМК рослинним матеріалом при максимальному розведенні 1:2048. Отримана антисироватка специфічна і не вступала в реакцію з екстрактами із здорових рослин-накопичувачів, картоплі і тест-рослин, інфікованих X-, S-, M-, Y-вірусами картоплі.

Приклад 2. Зберігання очищених препаратів Y-вірусу картоплі для одержання високоактивних діагностичних сироваток.

Використовували штам YBK-ли Y-вірусу картоплі, який зберігається в колекції фітопатогенних вірусів Інституту сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН.

Отримували чисті препарати Y-вірусу картоплі з високим ступенем чистоти (співвідношення  $D_{260/280}=1,2$ ) та концентрацією вірусу ( $2 \text{ мг/см}^3$ ), в яких виявили характерні за морфологічними ознаками частки з модальною довжиною  $740 \pm 5 \text{ нм}$ . Для іммобілізації до 30 % водного розчину мономерів об'ємом  $4 \text{ см}^3$  додавали при інтенсивному перемішуванні за допомогою магнітної мішалки  $8 \text{ см}^3$  очищеного вірусного антигену,  $0,3 \text{ см}^3$  2,5 % персульфату амонію та 3 краплі ТЕМЕД. Реакційну суміш розливали у скляні флакони по  $2 \text{ см}^3$  і витримували протягом 15-20 хв. для завершення процесу іммобілізації. Після полімеризації гелю флакони закупорювали і зберігали протягом 6-ти місяців при кімнатній температурі.

Дослідження іммобілізованих в ПААГ вірусних препаратів за різними строками зберігання перевіряли за допомогою електронної мікроскопії та методу біотестування. Іммобілізовані антигени у вигляді монолітного гелю, після 6-ти місяців зберігання, ретельно розтирали у фарфоровій ступці, ресуспендували у 0,1 М фосфатним буфером, рН 7,4 і центрифугували при 1000 g протягом 15 хв. Отримані супернатанти використовували для перевірки збереженості морфології вірусних часток та інфекційних властивостей препаратів.

Інфекційність іммобілізованих препаратів Y-вірусу картоплі перевіряли методом біотестування на рослинах тютюну справжнього і махорки. На всіх уражених рослинах ознак інфікування не спостерігали, що підтвердили данні серології та електронної мікроскопії. Тобто, вірусні препарати втрачають свою інфекційність після іммобілізації в ПААГ. Вивчення імуногенної активності показало, що іммобілізовані в ПААГ вірусні препарати здатні викликати у організмі імунізованих тварин утворення антитіл. Титр специфічних антитіл в реакції крапельної аглютинації становив 1:2048 в твердофазному імуноферментному аналізі - 1:512.

#### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб отримання діагностичних сироваток до фітопатогенних вірусів, що включає отримання очищених вірусних препаратів, імунізацію кролів антигеном, визначення якості отриманих діагностичних антисироваток, який **відрізняється** тим, що отриманий вірусний препарат поміщають в поліакриламідний гель, що забезпечує стабільність іммобілізованого вірусного препарату та не потребує використання ад'юванту.

---

Комп'ютерна верстка Л. Бурлак

---

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

---

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601