



ПОЛУЧЕНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ К КЛЕТОЧНЫМ МЕМБРАНАМ *XANTHOMONAS CAMPESTRIS*

ЩЕРБАКОВ Анатолий Анисимович, Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова

КУЗНЕЦОВ Михаил Андреевич, Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова

САВИНА Светлана Валерьевна, Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова

СКОРЛЯКОВ Виктор Михайлович, Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова

ИВАЩЕНКО Сергей Владимирович, Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова

МУРТАЕВА Вера Сергеевна, Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова

МАНИЕСОН Виктор Эммануэль, Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова

Рассмотрены дезинтегрированные мембраны *Xanthomonas campestris*, которые были использованы для получения гипериммунных сывороток с высоким содержанием специфических антител. Наиболее эффективным адъювантом при иммунизации оказался 0,05%-й раствор полиазолидинамммония, модифицированного гидрат-ионами галогенов.

Сосудистый бактериоз крестоцветных является одним из наиболее опасных заболеваний сельскохозяйственных культур. Он поражает практически все известные растения, относящиеся к семейству Крестоцветные. В частности, это относится к роду Капустные (*Brassicaceae*), большинство представителей которого являются возделываемыми культурами, имеющими важное продовольственное значение.

Поскольку возбудитель заболевания бактерия вида *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (*X. campestris*) – широко распространён в природе, профилактика и диагностика бактериозов является актуальной проблемой. Своевременная диагностика заболевания позволяет принимать решение по удалению зараженных объектов, тем самым снижая экономические затраты на хранение и переработку.

Согласно исследованиям, проведенным в Тимирязевской академии [4], наиболее эффективным методом диагностики сосудистого бактериоза капусты является иммуноферментный анализ. В ходе опытов с семенным материалом было показано, что он обладает высокой чувствительностью и позволяет выявлять наличие возбудителя при минимальной степени обсеменения. Кроме того, иммуноферментный анализ позволяет проводить диагностику с относительно малыми затратами и по сравнению с другими методами отличается простотой.

Все это позволяет говорить о том, что разработка новых способов получения гипериммунных сывороток для диагностики сосудистого

бактериоза крестоцветных является актуальной задачей.

В связи с вышесказанным целью работы являлось получение диагностической сыворотки, содержащей антитела к клеточным мембранам *X. campestris*.

Методика исследований. В ходе исследования изучали антиген, подбирали наиболее эффективный адъювант, определяли чувствительность и специфичность полученной гипериммунной сыворотки крови.

Необходимое для работы количество биомассы микроорганизмов *X. campestris* 611 получали по методике [2], адаптированной для используемой культуры. Жидкая питательная среда для культивирования *X. campestris* 611 имела следующий состав: пептон – 10 г, сахара – 10 г, натрия хлорид – 5 г, дрожжевой автолизат – 5 г, вода – 1000 мл. Культивирование производилось на шейкер-боксе в течение двух суток при температуре 28 °С и режиме встряхивания 155 мин⁻¹. Микробную биомассу отделяли от культуральной жидкости центрифугированием при 5500 g в течение 15 мин и сохраняли замораживанием при –18 °С.

Для получения дезинтегрированных клеточных мембран замороженная клеточная масса суспензировалась в 40 мл физиологического раствора. Затем полученную взвесь обрабатывали на звуковом дезинтеграторе марки UD-11 при 22 кГц в течение 10 циклов по 60 с. Между циклами делали перерыв продолжительностью 2 мин для охлаждения, проводимого на ледяной



адъюванта ПААГ на месяц раньше, чем полного адъюванта Фрейнда.

В контрольных группах высоких титров специфических антител не отмечено, что свидетельствует о стимулирующем влиянии адъювантов на антителогенез только в сочетании с антигеном (табл. 2).

В процессе иммунизации также наблюдалось отсутствие абсцессов в местах введения комплекса антиген + ПААГ и наличие данных образований при использовании ПАФ.

При оценке специфичности полученных гипериммунных сывороток крови отмечены их неспецифичные реакции с *P. aeruginosa* и представителями семейства *Enterobacteriaceae* в титрах 1:800–1:1600. Однако положительные титры специфических антител *X. campestris* 611 на порядок выше положительных титров антител к другим видам бактерий, что позволяет использовать полученные гипериммунные сыворотки при создании иммуноферментных тест-систем для диагностики сосудистого бактериоза крестоцветных (табл. 3).

Выводы. Препарат дезинтегрированных мембран *X. campestris* 611 может быть использован для получения гипериммунных сывороток с высоким содержанием специфических антител и конструирования на его основе иммуноферментных тест-систем для диагностики сосудистого бактериоза крестоцветных..

При иммунизации кроликов дезинтегрированными мембранами *X. campestris* 611 в качестве адъюванта следует использовать 0,05%-й раствор полиазилидинаммония, модифицированный гидрат-ионами галогенов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Иващенко С.В. Применение мембранных белков в диагностике иерсиниозов // Вестник Саратовского госагроуниверситета им. Н.И. Вавилова. – 2013. – № 2. – С. 17–18.
2. Рысмухамбетова Г.Е. Экзополисахариды ксантомонад и клебсиелл: физико-химические, биологические свойства и перспективы применения: автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Саратов, 2009. – 22 с.
3. Скорляков В.М., Савина С.В., Заярский Д.М., Трубкина М.В. Полимерный адъювант-антиген-носитель для вакцин // Патент РФ 2593012. 2016.
4. Усовершенствование диагностики зараженности семян капусты возбудителем сосудистого бактериоза методом иммуноферментного анализа / Е.С. Мазурин [и др.] // Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии. – 2009. – № 1. – С. 66–72.
5. Hornbeck P. Enzyme-linked immunosorbent assays // Current Protocols in Immunology, 1991, P. 212–2122.
6. Protein measurement with the Folin phenol reagent / O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall // J. Biol. Chem., 1951, Vol. 193, No. 1, P. 265–275.

Щербаков Анатолий Анисимович, д-р биол. наук, проф. кафедры «Микробиология, биотехнология и химия», Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова. Россия.

Кузнецов Михаил Андреевич, аспирант кафедры «Микробиология, биотехнология и химия», Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова. Россия.

Савина Светлана Валерьевна, канд. вет. наук, доцент кафедры «Морфология, патология животных и биология», Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова. Россия.

Таблица 2

Результаты определения антительной активности сывороток, полученных в контрольных группах, при изучении их в ИФА с дезинтегрированными мембранами *Xanthomonas campestris* 611 (1мкг/мл)

Время взятия сыворотки	Титры антител полученных сывороток в ИФА с ДМ										
	1:800	1:1600	1:3200	1:6400	1:12800	1:25600	1:51200	1:102400	1:204800	1:409600	1:819200
В группе ФР + ПАФ											
До иммунизации	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
После 2-й иммунизации	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–
После 4-й иммунизации	+	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–
После 6-й иммунизации	+	+	+	+	–	–	–	–	–	–	–
В группе ФР + ПААГ											
До иммунизации	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
После 2-й иммунизации	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–
После 4-й иммунизации	+	+	+	+	–	–	–	–	–	–	–
После 6-й иммунизации	+	+	+	+	–	–	–	–	–	–	–

Результаты определения специфичности сывороток после 6-й иммунизации, полученных в опытных группах, при изучении их в ИФА с клеточными антигенами (1 млрд клеток/мл)

Бактериальные клетки	Титры антител сыворотки							
	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400	1:12800	1:25600	1:51200
В группе ДМ + ПАФ								
<i>X. campestris</i>	+	+	+	+	+	+	–	–
<i>P. aeruginosa</i>	+	+	+	–	–	–	–	–
<i>Y. pseudotuberculosis</i>	+	+	+	–	–	–	–	–
<i>Y. enterocolitica</i>	+	+	+	–	–	–	–	–
<i>E. coli</i>	+	+	–	–	–	–	–	–
В группе ДМ + ПААГ								
<i>X. campestris</i>	+	+	+	+	+	+	–	–
<i>P. aeruginosa</i>	+	+	+	–	–	–	–	–
<i>Y. pseudotuberculosis</i>	+	+	+	–	–	–	–	–
<i>Y. enterocolitica</i>	+	+	–	–	–	–	–	–
<i>E. coli</i>	+	+	+	–	–	–	–	–

Скорляков Виктор Михайлович, д-р вет. наук, проф. кафедры «Морфология, патология животных и биология», Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова. Россия.

Ивашенко Сергей Владимирович, канд. биол. наук, доцент кафедры «Микробиология, биотехнология и химия», Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова. Россия.

Муртаева Вера Сергеевна, аспирант кафедры «Микробиология, биотехнология и химия», Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова. Россия.

Маниесон Виктор Эммануэль, студент факультета ветеринарной медицины, пищевых и биотехнологий, Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова. Россия.

410005, г. Саратов, ул. Соколова, 335.
Тел.: (8452) 69-25-32.

Ключевые слова: *Xanthomonas campestris*, дезинтегрированные мембраны; антитела; адъювант; полиазолидинаммоний.

OBTAINING SPECIFIC ANTIBODIES TO THE CELL MEMBRANE OF XANTHOMONAS CAMPESTRIS

Scherbakov Anatoly Anisimovich, Doctor of Biological Sciences, Professor of the chair "Microbiology, Biotechnology and Chemistry", Saratov State Agrarian University named after N.I. Vavilov. Russia.

Kuznetsov Mikhail Andreevich, Post-graduate Student of the chair "Microbiology, Biotechnology and Chemistry", Saratov State Agrarian University named after N.I. Vavilov. Russia.

Savina Svetlana Valerevna, Candidate of Veterinary Sciences, Assistant Professor of the chair "Morphology, Pathology of Animals and Biology", Saratov State Agrarian University named after N.I. Vavilov. Russia.

Skorlyakov Viktor Mihaylovich, Doctor of Veterinary Sciences, Professor of the chair "Morphology, Pathology of Animals and Biology", Saratov State Agrarian University named after N.I. Vavilov. Russia.

Ivaschenko Sergey Vladimirovich, Candidate of Biological Sciences, Assistant Professor of the chair "Microbiology, Biotech-

nology and Chemistry", Saratov State Agrarian University named after N.I. Vavilov. Russia.

Murtaeva Vera Sergeevna, Post-graduate Student of the chair "Microbiology, Biotechnology and Chemistry", Saratov State Agrarian University named after N.I. Vavilov. Russia.

Manieson Victor Emmanuel, Student of the faculty of Veterinary Medicine, Food and Biotechnology, Saratov State Agrarian University named after N.I. Vavilov. Russia.

Keywords: *Xanthomonas campestris*; disintegrated membrane; antibodies; adjuvant; poliazolidinammonium.

Xanthomonas campestris disintegrated membrane were used to obtain hyperimmune serum with a high content of specific antibody. The most effective immunization with adjuvant proved to be 0.05% solution poliazolidinammonium modified hydrate halogen ions.

