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.

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

Поскольку возбудитель заболевания терия 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, сахароза – 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 °C 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 °C.

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

АГРАРНЫЙ НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ



бане. Дезинтегрированная клеточная масса отделялась от неразрушенных клеток центрифугированием при 3500 g в течение 5 мин. Затем, центрифугированием при 5500 g в течение 15 мин, происходило отделение разрушенных клеточных стенок от цитоплазмы и периплазмы. Полученный осадок суспензировали в 2%-м растворе додецилсульфата натрия (SDS) из расчета 1 г массы клеточных стенок на 10 мл раствора. Суспензированную массу выдерживали в течение суток на шейкер-боксе при температуре 20 °C и режиме встряхивания 120 мин-1. Далее проводилось освобождение раствора от SDS диализом в течение трех суток в проточной воде. Полученный препарат концентрировался в потоке воздуха и сохранялся замораживанием [1].

Концентрацию белков в препарате определяли спектрофотометрически по методу Лоури [6].

Гипериммунную сыворотку получали подкожной иммунизацией кроликов вдоль спины в 3-4 точки в 1 мл смеси антигена и адъюванта в соотношении 1:1 с интервалом между последующими иммунизациями в 2 недели. Всего было проведено 7 иммунизаций. Кровь для исследования брали перед каждой иммунизацией. В качестве антигена использовали препарат дезинтегрированных мембран (ДМ) X. campestris 611 с концентрацией белка 2 мг/мл. В контрольных группах антиген заменяли физиологическим раствором (ФР). С целью оптимизации процесса иммунизации и улучшения характеристик получаемых сывороток была проведена сравнительная оценка двух адъювантов: 1 – полный адъювант Фрейнда $(\Pi A \Phi)$; 2 – химическая полиэлектролитная субстанция, состоящая из 0,05%-го раствора полиазолидинамммония, модифицированного гидратионами галогенов, в физиологическом растворе (ПААГ) [3]. Всего было иммунизировано 4 группы кроликов: 1 - ДМ + ΠΑΦ; 2 - ДΜ + ΠΑΑΓ; 3 - ΦP + ΠΑΦ; 4 - ΦP + ΠΑΑΓ.

Чувствительность и специфичность гипериммунных сывороток изучали в непрямом твердофазном иммуноферментном анализе на планшетах (Linbro, США) (ИФА) [5].

В ИФА использовали дезинтегрированные мембраны *X. сатреstris* 611, формалинизированные клетки *Xanthomonas campestris* 611 (получен из коллекции ризосферных бактерий ИБФРМ РАН), *Pseudomonas aeruginosa* АТСС-9027 (*P. aeruginosa*) (получен из ВКПМ ФГУП ГосНИИГенетика), *Yersinia pseudotuberculosis* III (*Y. pseudotuberculosis*), *Yersinia enterocolitica* 66-82 (O:3) (*Y. enterocolitica*), *Escherichia coli* 1027 (получены из ГКПМ ФГУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора).

Результаты исследований. Получение антител к дезинтегрированным мембранам *X. сатреstris* 611 и определение их иммунологической активности и специфичности предполагали их использование в реакциях по выявлению возбудителя сосудистого бактериоза крестоцветных.

Как видно из табл. 1, иммунизация кроликов дезинтегрированными мембранами *X. сатреstris* 611 позволила получить сыворотки крови с высоким титром специфических антител. Максимальный титр специфических антител в крови обеих опытных групп иммунизированных животных составил 1:409600, однако следует отметить, что количество антител достигало максимального уровня при использовании в качестве

Таблица 1

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

	Титры антител полученных сывороток в ИФА с ДМ											
Время взятия сыворотки	1:800	1:1600	1:3200	1:6400	1:12800	1:25600	1:51200	1:102400	1:204800	1:409600	1:819200	
В группе ДМ + ПАФ												
До иммунизации	+	-	-	-	_	-	-	_	_	_	_	
После 1-й иммунизации	+	+	+	+	_	_	_	_	_	_	_	
После 2 иммунизации	+	+	+	+	+	+	-	_	_	_	-	
После 3-й иммунизации	+	+	+	+	+	+	+	+	+	_	-	
После 4-й иммунизации	+	+	+	+	+	+	+	+	+	_	-	
После 5-й иммунизации	+	+	+	+	+	+	+	+	+	_	-	
После 6-й иммунизации	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	_	
После 7-й иммунизации	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	_	
		В	группе	ДМ + П	ААГ							
До иммунизации	+	-	_	-	_	-	_	_	_	_	_	
После 1-й иммунизации	+	+	+	+	-	-	-	_	-	_	-	
После 2-й иммунизации	+	+	+	+	+	-	-	_	_	_	_	
После 3-й иммунизации	+	+	+	+	+	+	+	+	+	_		
После 4-й иммунизации	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
После 5-й иммунизации	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	_	
После 6-й иммунизации	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
После 7-й иммунизации	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	





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. сатреstris* 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 полиазолидинамммония, модифицированный гидрат-ионами галогенов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Иващенко С.В. Применение мембранных белков в диагностике иерсиниозов // Вестник Саратовского госагроуниверситета им. Н.И. Вавилова. 2013. N^2 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. N° 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)

	Титры антител полученных сывороток в ИФА с ДМ										
Время взятия сыворотки	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	+	+	+	ı	ı	-	ı	_	_	-	_
После 6-й иммунизации	+	+	+	+	_	_	-	_	_	_	-
		Е	3 группе	ФР + П	ААГ						
До иммунизации	+	_	-	-	-	-	1	-	-	-	-
После 2-й иммунизации	+	+	-	_	_	-	_	-	-	-	-
После 4-й иммунизации	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
После 6-й иммунизации	+	+	+	+	_	_	_	-	_	_	_

06 2017



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

	Титры антител сыворотки											
Бактериальные клетки	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400	1:12800	1:25600	1:51200				
		В групп	е ДМ + ПА	ΔФ	,		1					
X. campestris	+	+	+	+	+	+	_	_				
P. aeruginosa	+	+	+	_	_	_	_	_				
Y. pseudotuberculosis	+	+	+	_	_	_	_	_				
Y. enterocolitica	+	+	+	_	_	_	_	-				
E. coli	+	+	_	_	_	_	_	_				
В группе ДМ + ПААГ												
X. campestris	+	+	+	+	+	+	_	ı				
P. aeruginosa	+	+	+	_	_	-	-	-				
Y. pseudotuberculosis	+	+	+	-	-	-	-	-				
Y. enterocolitica	+	+	-	-	-	-	-	-				
E. coli	+	+	+	_	_	_	_	_				

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

Иващенко 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. Соколовая, 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, Assistent 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, Assistent Professor of the chair "Microbiology, Biotechnology 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; poliazolidinammmony.

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 poliazolidinammoniya modified hydrate halogen ions.



