

УДК 57.08:632.3

**РОЗРОБКА ДІАГНОСТИЧНОЇ ТЕСТ-СИСТЕМИ НА ВИЯВЛЕННЯ  
ВІРУСУ ОГІРКОВОЇ МОЗАЇКИ МЕТОДОМ ПОЛІМЕРАЗНОЇ  
ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ**

**І.О. АНТІШОВ**, кандидат сільськогосподарських наук,

**К.В. ГРИНЧУК**, магістр, **КОШЕЛЬ І.М.** аспірант

**В.Г. СПИРИДОНОВ**, кандидат біологічних наук

**М.Д. МЕЛЬНИЧУК**, доктор біологічних наук

*Розроблена діагностична тест-система на основі полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) для виявлення вірусу огіркової мозаїки (ВОМ) в біологічному матеріалі. Проведено оптимізацію умов ампліфікації.*

**Ключові слова:** вірус огіркової мозаїки, полімеразна ланцюгова реакція, діагностичні тест-системи.

Поширеність хвороб вірусної етіології в агроценозах нашої країни, останнім часом набуває загрозливих форм. Вірусні хвороби значною мірою призводять до зниження врожайності сільськогосподарських культур та погіршення якості продукції. Нині не існує надійних засобів для боротьби з вірусними інфекціями, що пов'язане з особливостями біології їх збудників. Таким чином, єдиним дієвим засобом упередження поширення вірусів є їх вчасна діагностика.

Вірус мозаїки огірків один з найпоширеніших у природі вірусів. Вірус-поліфаг. Він уражає до 200 видів рослин, що належать до 60 родин, але найбільшої шкоди завдає огіркам відкритого ґрунту. Уражуються овочеві культури (томати, перець, селера, морква, укріп, петрушку, салат, шпинат, цибуля, капуста, картопля), бобові (горох, квасоля, люпин), а також кукурудза, тютюн, махорка, буряк цукровий, плодові і ягідні культури, виноград, гранат, цитрусові [2].

Вірус огіркової мозаїки належить до родини Bromoviridae, роду Cucumovirus. Віріони ізометричні, можуть бути різних типів, але усі

близько 29 нм у діаметрі [3]. Нуклеїнова кислота представлена трьома молекулами лінійної позитивно-геномної олРНК [1, 6].

Нині перспективним і точнішим методом детекції вірусної інфекції є метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Перевагами цього методу діагностики є висока чутливість та можливість визначення штамової різноманітності вірусів.

**Метою роботи** було розробити діагностичну тест-систему на виявлення вірусу огіркової мозаїки методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) та здійснити оптимізацію умов проведення реакції ампліфікації.

**Методика досліджень.** Матеріалом для тестування вірусу огіркової мозаїки були листкові пластини рослин томатів.

Сумарну РНК виділяли за допомогою комерційного набору «Tryzol» згідно з рекомендаціями виробника.

Дизайн праймерів для ПЛР проводили, аналізуючи консервативні нуклеотидні послідовності гена, що кодує білок оболонки цього вірусу, за допомогою програмного забезпечення «Primer3», реакцію зворотної транскрипції - за допомогою комерційного набору «Реверта-L-100» за рекомендацією виробника, а полімеразну ланцюгову реакцію - у реакційній суміші об'ємом 25 мкл, яка містила 1x ПЛР буфер з 1,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,2 мМ дезоксинуклеозидтрифосфатів, 0,5 мкМ специфічних олігонуклеотидних праймерів, 10-50 нг матричної ДНК, 1 U Taq полімерази (Ампли Сенс).

Полімеразну ланцюгову реакцію здійснювали в ампліфікаторі “GeneAmp 2400” (Applied Biosystems) за таких умов: початкова денатурація ДНК при температурі 94<sup>0</sup>С – 5хв, послідовні тридцять циклів: денатурації при температурі 94<sup>0</sup>С – 30 с, відпалу праймерів при температурі 56<sup>0</sup>С - 30с, елонгації при температурі 72<sup>0</sup>С - 30с.

Після проведення ПЛР продукти реакції розділяли електрофорезом у 1%-вому агарозному гелі. Після завершення електрофорезу гель

зabarвлювали 1%-вим розчином бромового етидію, візуалізували за допомогою UV трансільюмінатору і фотографували.

**Результати досліджень.** Для створення дизайну праймерів, специфічних до нуклеотидних послідовностей вірусу огіркової мозаїки провели біоінформативний аналіз, першим етапом якого був скринінг консервативних послідовностей генів, що кодують білок оболонки вірусу за допомогою генетичного банку даних (GenBank). На підставі узагальнених даних щодо відомих нуклеотидних послідовностей вірусних геномів виявили специфічні консервативні нуклеотидні послідовності, які в подальшому використали як матриці для олігонуклеотидних затравок у процесі синтезу вірусспецифічних фрагментів нуклеїнових кислот. Аналіз здійснювали за допомогою програмного забезпечення «MultAline» (Multiple sequence alignment) [5].

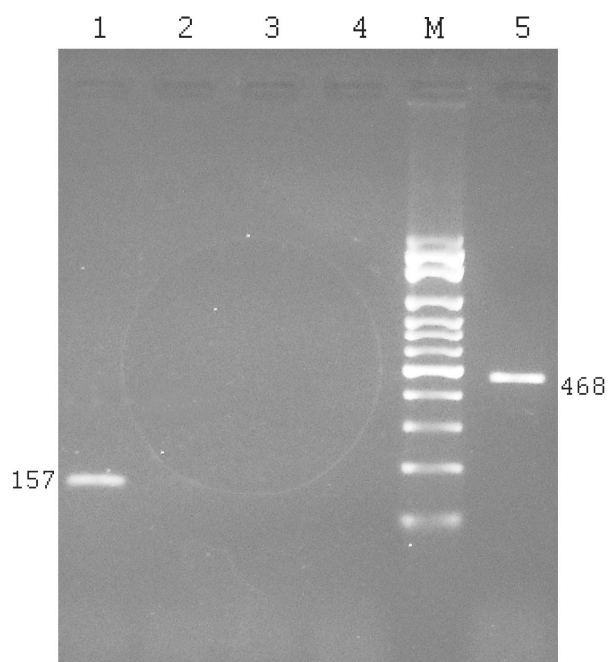
На основі аналізу консервативних послідовностей були синтезовані олігонуклеотидні праймери, які відповідали таким вимогам: GC-склад ~ 40—60 %, відсутність неспецифічних вторинних структур (шпильок, димерів), близькі температури відпалу обох праймерів.

Відомо, що геном вірусу огіркової мозаїки представлений трьома молекулами лінійної позитивно-геномної олРНК, тому геномну РНК вірусу виділяли разом з РНК рослин томатів, а сумарну - стандартною методикою [4]. На останньому етапі сумарну РНК розчиняли в 50 мкл DEPC (диетилпірокарбонат) -воді. Зразки РНК зберігали при температурі мінус 20<sup>0</sup>С.

Сумарну РНК у кількості 1 мкг використовували в реакції реверс-транскрипції для одержання комплементарної ДНК (кДНК). Синтез першого ланцюга кДНК ініціювали за допомогою 0,15 мкг випадкових гексануклеотидів (рандом праймерів) та 50 U зворотної транскриптази M-MLV. Реакція проходила за стандартних умов - 1 година при температурі 37<sup>0</sup>С. Отриману кДНК розводили в два рази TE-буфером.

Полімеразну ланцюгову реакцію проводили у реакційній суміші об'ємом 25 мкл, яка містила ПЛР-буфер з 1,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,2 мМ dNTPs, 0,5 мкМ специфічних олігонуклеотидних праймерів, 1 U Taq-полімерази

та 10 мкл одержаної кДНК (10-50 нг) з таким температурним режимом: температура плавлення ДНК - 94<sup>0</sup>С, відпалу - 56<sup>0</sup>С, синтезу - 72<sup>0</sup>С, кількість циклів ампліфікації – 30. Як внутрішній контроль виділення РНК та ПЛР використовували систему, спрямовану на виявлення мРНК, що кодує клітинний фактор елонгації EF1- $\alpha$ .



Електрофореграма продуктів ПЛР аналізу визначення ВОМ 1-4 – аналізовані зразки томатів. 5 - внутрішній контроль виділення РНК; М – маркер довжин фрагментів (пар нуклеотидів).

Електрофоретичний аналіз продуктів ампліфікації у 1,0%-вому агарозному гелі показав наявність специфічних фрагментів ДНК відповідного розміру, заданого параметрами системи (рисунок). На електрофореграмах чітко видно продукт ампліфікації клітинного фактора елонгації EF1- $\alpha$  з відповідним розміром – 468 пар нуклеотидів. Присутність продуктів ампліфікації внутрішнього контролю фактора елонгації EF1- $\alpha$  в усіх зразках вказує на якість виділених препаратів РНК, зворотної транскрипції та специфічної ампліфікації вірусних генів.

У біологічних зразках виявлено присутність вірусу оігрової мозаїки. Розмір продукту ампліфікації - 157 п.н. Наявність продуктів

ампліфікації відповідного розміру доводить працездатність новоствореної діагностичної тест-системи.

**Висновки.** Розроблено діагностичну тест-систему на основі полімеразної ланцюгової реакції для виявлення вірусу огіркової мозаїки. Виявлено специфічні фрагменти вірусного генома, чим доведено працездатність новоствореної діагностичної тест-системи. Запропоновано використовувати метод ПЛР як високочутливий метод діагностики та ідентифікації ВОМ.

### Список літератури

1. Крылов А.В. Вирусы растений Дальнего Востока. Кукумовирусы. / А.В. Крылов // Влияние вирусов на обмен растений. – Владивосток: Б.и.,1983. – С. 45-48.
2. Крылов А.В. Вирусы растений Дальнего Востока. Сообщение 1. Рабдо-; бромово- и комовирусы / А.В. Крылов // Вирусные болезни растений. – Владивосток: Б. и., 1981 – С. 62-67.
3. Моніторинг вірусних інфекцій рослин в біоценозах України. / За редакцією В.П. Поліщука / В.П. Поліщук, І.Г. Будзанівська, С.М. Рижук та ін – К.: Фітосоціоцентр, 2001. – 220 с.
4. Chomezynski P. “Single-step method of RNA isolation by guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction” / P. Chomezynski, N. Sacchi // *Analyt. Biochem.* 1987, v.11, 2, p. 156-159.
5. Corpet F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering / F. Corpet // *Nucl. Acids Res.* - 1988. - Vol. 16, №22. – P. 10881-10890.
6. Francki R.I.B. Cucumber mosaic virus / R.I.B. Francki, D.W. Mossop, T. Hatta CMI/AAB. *Descr. Plant Viruses.* – 1979. – N 13. – P. 213/1 – 213/6.

**РАЗРАБОТКА ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ НА  
ВИАВЛЕНИЕ ВИРУСА ОГУРЕЧНОЙ МОЗАИКИ МЕТОДОМ  
ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ**

**И.А. АНТИПОВ** кандидат сельскохозяйственных наук,  
**К.В. ГРИНЧУК** магистр, **КОШЕЛЬ И.Н.** аспирант,  
**СПИРИДОНОВ В.Г.** кандидат биологических наук.,  
**МЕЛЬНИЧУК М.Д.** доктор биологических наук

*Разработана диагностическая тест-система на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР) для определения вируса огуречной мозаики (ВОМ) в биологическом материале. Проведена оптимизация условий амплификации.*

Ключевые слова: вирус огуречной мозаики, полимеразная цепная реакция, диагностические тест-системы.

**DEVELOPMENT OF DIAGNOSTIC TEST-SYSTEM FOR CUCUMBER  
MOSAIC VIRUS PCR DETECTION**

**Antipov I., Grinchuk K., Koshel I., Spyrydonov V., Melnychuk M.**

*The diagnostic test system, based on polymerase chain reaction (PCR), has been developed for detection of Cucumber mosaic virus (CMV) in biological material. Optimization of the amplification regime has been carried out.*

Key words: cucumber mosaic virus, polymerase chain reaction, diagnostic test system.