

УДК: 606:577.213:632.3:633.63

ПЛР ІДЕНТИФІКАЦІЯ РНК-3 УКРАЇНСЬКОГО ІЗОЛЯТУ ВІРУСУ НЕКРОТИЧНОГО ПОЖОВТІННЯ ЖИЛОК БУРЯКУ

К. В. ГРИНЧУК, аспірантка¹

І. О. АНТІПОВ, кандидат сільськогосподарських наук

Проведено біоінформативний аналіз нуклеотидних послідовностей РНК-3 ізолятів вірусу некротичного пожовтіння жилок буряку (ВНПЖБ). Встановлено консервативні послідовності гена, що кодує протеїн Р25 ВНПЖБ та розроблено дизайн праймерів для ідентифікації РНК-3. Оптимізовано ПЛР систему ідентифікації РНК-3 за температурними показниками відпалу праймерів.

Ключові слова: вірус некротичного пожовтіння жилок буряку, полімеразна ланцюгова реакція, ідентифікація, ген, праймер

Вірус некротичного пожовтіння жилок буряку (Родина *Benyvirus*) (+) РНК вмісний вірус з мультипартидним геномом, містить РНК-1, РНК-2, РНК-3, РНК-4, у деяких випадках РНК-5 [4, 6]. ВНПЖБ призводить до проліферації корінців від головного кореня, зменшення розміру коренеплоду і пожовтіння жилок листка. РНК-3 ВНПЖБ довжиною 1175 нуклеотидів, за винятком Poly(A)-хвоста, кодує протеїн 25 кДа (Р25, положення 445-1102 н.) і є важливим для формування симптомів ураження рослин [1].

На експериментальних рослинах *Chenopodium quinoa* РНК-3 формує локальні некрози. На інокульованих чутливих рослинах та частково стійких сортах буряку за наявності РНК-3 спостерігається формування локальних некротичних [5]. Ізоляти ВНПЖБ, які мають РНК-3 містять більш виражені локальні ураження тоді, коли за відсутності РНК-3 на рослинах спостерігаються слабші

¹ Науковий керівник – кандидат сільськогосподарських наук, доцент І. О. Антіпов

симптоми ураження. РНК-3 виконує функцію мультиплікації та руху вірусу в коренях коренеплоду [2, 3].

Мета дослідження. Розробка ПЛР-системи для ідентифікації РНК-3 вірусу некротичного пожовтіння жилок буряку.

Матеріали і методи дослідження. Для пошуку нуклеотидних послідовностей РНК-3 та проведення біоінформативного аналізу було використано базу даних NCBI (National Center for Biotechnological Information) [9]. Біоінформативний аналіз геномів проводили, використовуючи програмне забезпечення «MultAline» (Multiple sequence alignment) [7]. Дизайн праймерів розробляли, використовуючи програмне забезпечення «Primer3» [8].

Екстракцію РНК здійснювали з використанням комерційного набору «РИБО-Сорб» (AmpliSens, Росія), реакцію зворотної транскрипції – за допомогою комерційного набору «Реверта-L-100» (AmpliSens, Росія), згідно з рекомендаціями виробника.

Реакційна суміш для проведення полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), об'ємом 15 мкл містила: 1x ПЛР буфер з 1,5 мМ $MgCl_2$ (AmpliSens, Росія), 0,2 мМ дезоксинуклеозидтрифосфатів (дНТФ) (AmpliSens, Росія), 1 пкмоль кожного з олігонуклеотидних праймерів, 10-40 нг кДНК, 0,5 U Taq-полімерази (AmpliSens, Росія). Реакцію ампліфікації проводили в ДНК-ампліфікаторі «Терцик» ТП4-ПЦР-01.

Після ампліфікації продукти ПЛР розділяли методом горизонтального електрофорезу в 1,5%-ному агарозному гелі, який готували, використовуючи TBE буфер з концентрацією 0,5 мг/мл броміду етидію. Результати ПЛР візуалізували УФ променями транслюмінатора (Т-312-С), фотографували, використовуючи цифровий фотоапарат “Sony” (DSLR A-500).

Результати дослідження. Проведено вирівнювання нуклеотидних послідовностей РНК-3 ВМПЖБ. До аналізу залучили 266 фрагментів нуклеотидних послідовностей РНК-3 ВМПЖБ, які зареєстровано в системі

генетичної бази даних NCBI. На основі аналізу побудовано консенсусну нуклеотидну послідовність повнорозмірної РНК-3 ВПЖБ (рис.1). Показано консервативні (заглавні літери) та поліморфні (великі літери) фрагменти геномної РНК-3 ВПЖБ. Суворо консервативні фрагменти відбирали для подальшого дизайну відповідних праймерів. Поліморфні ділянки геному виключалися з аналізу. Таким чином забезпечується створення універсальної системи ідентифікації РНК-3 існуючих патотипів та можливих ізолятів ВПЖБ.

```

AAATTCAAAA TTTACCATTA CATATTGGTA TtTATTACC CTCAGTTGGT GATATATGTG AGGACGCTAG
CCTGTTGGGT TTCSTGACCG ACCAAATCCA AGCGAGCTTA ATCCAAGTAC STCGTCTCAA ATTGAGTGTC
AAGTGAATAA GCATAGTGAC cCCATCGTTT CAGGGTAGTT gACGGCTATT AATAGAcATA tTACaAACGC
TTCTSTTTAT TTATCaCCAA CATGGGATGT AATGTTTATG CGTGAGCcTA CGGCCGCATT GTAAAAATTAG
TGGTTTTTGA TTTCTATTCT tCGGAATATA CAAGTTTAA AAGACCAGCa TTTGGGTAA AATTTTTTAA
ACSTTACTAT CtTTaACTAG tAACTcGAAC TCGATTATA TTCAGATTTT aaataTCaaG TTGTTGTGTT
tTCTGATcAT CATTAAGTGA CCGtCATGGG TGATATATTA GGCGCAGTTT ATGATTTAGG GCACAGACCT
TACSTAGCAC GGCGTAcGGT TTATGAGGAT CGTTTGAtTC TTAGcACAcA TGGTAATaTC TGTCGgGCTA
TTAACTTGtT AACTCACGAT AATCGtACTa CACTGGTGTA TCACAATAAt ACTAAACGCA TAAGGTTTCG
TGGaTTATTG TGTgcTtaTC aTggGCSTTA TTGTGGGTTT CGTGCSTTAT GTAGAGTAAT GTTATGTTct
cTACCTCGTT TGTGTgACAT CCSTATCAAT GGATCTcgcG aCTTTGTTgc agATCCtACC AGACTCGACA
GCTCTGtTAA TGAGTTGcTG GTTCTAaTG GTCTCGTCat CCACTATGAT CGTGTTCATc ATGtTCCctT
ACAcACTGAt GGTTtTGAAG TTGTAGAtTT cACGACTGTC TttCGTGTC CtGGAAAcTT TCTTTGcCT
AATGCAACAA ATTTCCCTCG GcCaACCACA ACCGATCAGG TTTACATGGT gTgTTTGgTA AACACGGTTa
ATTGTGTGTT ACGTTTTgAG TcCGaACTTa cAGTGTGGgt TCACTCTGGT TTGTATaCAG GtGATGTTTT
AGATGTGGAT AATAATGTTA TTCaAGCCCC TGaCGGTGTT GATGATgATG aTTAGAGTTa TCACAATTC
AACAACACAC TtaTTGGTGT GTTGTCTGT TACACCATTT GAAAGTTTAA TAATtGTCTC AaTtCGATtG
TTGATCTGGT TGGGACAAAT ATTTATTTT STTTTGGTgt AATCGTCCGA AGACGTTAAA CTACACGTGA
TTTCACGGTG TTCGATGAGA AGATTGTTTA ACGGTGTtAC GTTGTgtAcc TTTAAGctTT CTTCCTCaTTT
tACCACATGT GATGATTGTA GCCTGTGGGT tGTTATGTGG ACAATTATGG TTACTTATTT GTAAAtGaTA
AAGAGTGTGC gGTAGCcGAC TTTATgCGAG TGGGAGTAGT TGTGTTATTA СТАСТАТСТ GGTtCGTATA
AAGATCSTTG ACGGCGGCAT CGTGGGTTC ACAGCCGGT ACATGgtGTT CCCGTCCGT TACGAAGGTT
TAACTGTGAG CSTTGATTT TACaAATACA CAGTTTTTAT CtTAACAGGC TCGTTcACA GCCTCSTTTT
ACATTAAGTT TAAAGgtTTA TGTGGACACA AAAATATGGC TTATTGGTTA TGCTAAACCT CATATCATGT
TATAaTATtC GTTtCaTAtT ATAATTAagG tTAAGATGTA CTGActGGGT GtGAAATGTA CCAGTcSTTG
TAGGGTtCTT TGTCAGTATA TTGACAAAAA AAAAAAAAAA

```

Рис.1. Консенсусна послідовність РНК-3

Створено дизайн праймерів з оптимальними характеристиками. Для синтезу було обрано праймери Forward 5'- TGTGGGTTTCGTGCCTTATG -3' та Reverse 5'- CGTCAGGGGCTTGAATAACATT-3' з назвами відповідно P25-F та P25-R. Розрахункова оптимальна температура відпалу становить для Forward праймеру 58,47⁰ С, а для Reverse праймеру 58,98⁰ С, вміст дезоксиуанозин-5'-фосфату та

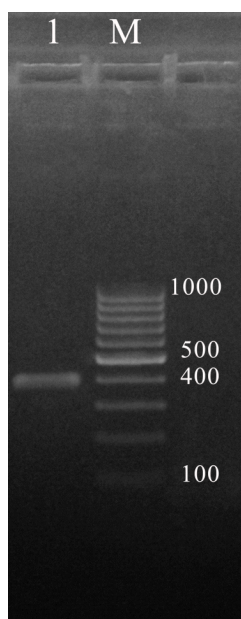


Рис. 3. Електрофореграма продукту ПЛР аналізу визначення РНК-3 ВВПЖБ: М (GeneRuler 10 bp DNA Lader 0241) – маркер довжин фрагментів (пар нуклеотидів)

У результаті візуалізації ПЛР продуктів ампліфікації виявлено фрагменти розміром 424 пари нуклеотидів. Наявність на електрофореграмі очікуваного продукту реакції свідчить, що розроблена система ідентифікації РНК-3 ВВПЖБ є ефективною (рис.3). На наступному етапі дослідження нам належало підібрати робочі температури відпалу праймерів. Здійснювали серію реакцій з різними температурними режимами відпалу праймерів від 50°C до 64°C . ПЛР проводили за таких умов: початкова денатурація 5 хв – 94°C ; 20 циклів: денатурація 30 с – 94°C , відпал праймерів 30 с – 50°C – 64°C , елонгація 30 с – 72°C , заключний синтез 72°C – 7 хв.

Хоча температурний режим відпалу праймерів на ефективність реакції ампліфікації суттєво не впливав, нами було встановлено, що більш оптимальна температура знаходиться в межах 50°C – 60°C .



Рис. 4. Електрофореграма оптимізації температури відпалу праймерів для ідентифікації гена P25: 1 – 50⁰ C, 2 – 52⁰ C, 3– 54⁰ C, 4 – 56⁰ C, 5 – 58⁰ C, 6 – 60⁰ C, 7 – 62⁰ C, 8 – 64⁰ C, М (GeneRuler 10 bp DNA Lader 0241) – маркер довжин фрагментів (пар нуклеотидів)

За цих умов неспецифічних продуктів ампліфікації не спостерігали, а кількість ампліконів була достатньою для чіткої візуалізації в агарозному гелі (рис.4).

Висновки. 1. Проведено біоінформативний аналіз нуклеотидних послідовностей РНК-3 ізолятів вірусу некротичного пожовтіння жилок буряку (ВНПЖБ). 2. Показано консервативні послідовності гена, що кодує протеїн P25 ВНПЖБ та здійснено дизайн праймерів для ідентифікації РНК-3 ВНПЖБ. 3. Оптимізовано ПЛР систему ідентифікації РНК-3 ВНПЖБ за температурними показниками відпалу праймерів.

Список літератури

1. cDNAs of beet necrotic yellow vein virus RNAs 3 and 4 are rendered biologically active in a plasmid containing the cauliflower mosaic virus 35S promoter / Commandeur U., Jarausch W., LI Y., Koenig R. [et al] // Virology. – 1991. – №185. – P.493 – 495.

2. Effect of recombinant beet necrotic yellow vein virus with different RNA compositions on mechanically inoculated sugarbeets. / Koenig, R., Jarausch, W., Li, Y., [et al] // J. Gen. Virol. – 1991. – № 72. – P. 2243 – 2246.
3. Koenig R. Mechanical inoculation of sugarbeet roots with isolates of beet necrotic yellow vein virus having different RNA compositions / R. Koenig, W. Burgermeister // J. Phytopathol. – 1989. – № 124. – P. 249 – 255.
4. Nucleotide sequence of beet necrotic yellow vein virus RNA-1 / Bouzoubaa S., Quillet L., Guilley H. [et al] // J. Gen. Virol. – 1987. – № 68. – P. 615 – 626.
5. Two proteins encoded by beet necrotic yellow vein virus RNA 3 influence symptom phenotype on leaves / Jupn, I., Guilley, H., Richards, K. E. [et al] // E.M.B.O. J. – 1992. – № 11. – P. 479 – 488.
6. Virus Taxonomy: The Classification and Nomenclature of Viruses / Fauquet C.M., Mayo M.A., Maniloff J. [et al] // The Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses (book). – San Diego, CA, USA.: Elsevier Academic Press., 2005. – P. 1162.
7. Web-сайт «Multiple sequence alignment by Florence Corpet»: [Электронный ресурс]. – Режим доступа: multalin.toulouse.inra.fr/multalin/.
8. Web-сайт «Primer3 web version 4.0.0 Pick primers from a DNA sequence»: [Электронный ресурс]. – Режим доступа: primer3.ut.ee/.
9. Web-сайт «National Center for Biotechnological Information»: [Электронный ресурс]. – Режим доступа:

ПЦР ИДЕНТИФИКАЦИЯ РНК-3 УКРАИНСКОГО ИЗОЛЯТА ВИРУСА НЕКРОТИЧЕСКОГО ПОЖЕЛТЕНИЯ ЖИЛОК СВЕКЛЫ

ГРИНЧУК К. В., АНТИПОВ И. А.

Проведен биоинформативный анализ нуклеотидных последовательностей РНК-3 изолятов вируса некротического пожелтения жилок свеклы (ВНПЖС). Показаны консервативные последовательности гена, который кодирует протеин Р25 ВНПЖС и разработан дизайн праймеров для идентификации РНК-3 ВНПЖС.

Оптимизирована ПЦР система идентификации РНК-3 ВНПЖС по температурным показателям отжига праймеров.

Ключевые слова: вирус некротического пожелтения жилок свеклы, полимеразная цепная реакция, идентификация, ген, праймер

RNA-3 PCR IDENTIFICATION OF UKRAINIAN ISOLATE OF BEET NECROTIC YELLOW VEIN VIRUS

K. GRYNCHUK, I. ANTIPOV

The bioinformatic analysis of the nucleotide sequences of RNA-3 virus isolates of beet necrotic yellow vein (BNYVV) was made. The conserved sequences of a gene that encodes a protein 25 have been shown. Primers design for identification of RNA-3 has been made. The PCR system for RNA-3 identification was optimized by temperature rates of primer annealing.

Key words: beet necrotic yellow vein virus, polymerase chain reaction, identification, gene, primer