УДК: 606:577.213:632.3:633.63

РОЗРОБКА МОЛЕКУЛЯРНО-БІОЛОГІЧНОЇ СИСТЕМИ ДЛЯ ІДЕНТИФІКАЦІЇ РНК-1 УКРАЇНСЬКОГО ІЗОЛЯТУ ВІРУСУ НЕКРОТИЧНОГО ПОЖОВТІННЯ ЖИЛОК БУРЯКУ

К.В. Гринчук, *аспірант**
І.О. Антіпов, *кандидат сільськогосподарських наук*
Національний університет біоресурсів і природокористування України

Проведено біоінформативний аналіз нуклеотидних послідовностей РНК-1 ізолятів вірусу некротичного пожовтіння жилок буряку. Встановлено консервативні послідовності гена, що кодує протеїн Р237 цього вірусу та розроблено дизайн праймерів для ідентифікації його РНК-1. Оптимізовано систему полімеразної ланцюгової реакції ідентифікації РНК-1 за температурними показниками відпалу праймерів.

Вступ. Вірус некротичного пожовтіння жилок буряку (ВНПЖБ) є збудником ризоманії – хвороби, що уражує цукрові, кормові та столові буряки. Вперше цей вірус було зафіксовано в 1952 р. на півночі Італії [1], наразі ж його знаходять скрізь, де вирощуються цукрові буряки. Патоген відноситься до роду *Benyvirus*, який включає в себе віруси, що передаються плазмодіафоровим грибом *Polymyxa betae* [4]. Геном ВНПЖБ мультипартидний, представлений чотирма сегментами одноланцюгової (+) РНК. Деякі ізоляти мають п`ять сегментів РНК [5].

РНК-1 (довжиною 6746 нуклеотидів, за виключенням полі(А)-хвоста) ВНПЖБ містить одну відкриту рамку зчитування, яка транслюється з утворенням поліпротеїну 237 кДа (Р237) зі стартовим кодоном у положенні 154 нуклеотидної послідовності РНК-1 або протеїну розміром 220 кДа (Р220) зі стартовим кодоном у положенні 496 [5]. На РНК-1 містяться: метилтрансферазний мотив у N-кінцевій частині поліпротеїну, хеліказний та протеазний мотив у центральній частині, мотив РНК-залежної РНК-полімерази в С-термінальній області [2]. У результаті посттрансляційного процессінгу утворюються білки масою 150 і 66 кДа, які містять полімеразний домен [2]. РНК-1 відповідає за реплікацію вірусу [3].

Матеріали і методи. Для пошуку нуклеотидних послідовностей РНК-1 та проведення біоінформативного аналізу користувались базою даних NCBI (National Center for Biotechnological Information) [7]. Біоінформативний аналіз геномів проводили за допомогою програмного забезпечення «MultAline» (Multiple sequence alignment) [6]. Дизайн праймерів розробляли із засто-

*Науковий керівник – доцент І.О. Антіпов.

суванням програмного забезпечення «Primer3» [8].

Екстракцію РНК проводили з використанням комерційного набору «РИБО-Сорб» (AmpliSens, РФ), а реакцію зворотної транскрипції – «Реверта-L-100» (AmpliSens, РФ), згідно рекомендацій виробника.

Реакційна суміш для проведення полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), об'ємом 15 мкл містила: 1× ПЛР буфер з 1,5 мМ MgC_{l2} (AmpliSens, РФ), 0,2 мМ дезоксинуклеозидтрифосфатів (дНТФ) (AmpliSens, РФ), 1 пкмоль кожного з олігонуклеотидних праймерів, 10–40 нг кДНК, 0,5 U Taq-полімерази (AmpliSens, РФ). Реакцію ампліфікації проводили в ДНК-ампліфікаторі «Терцик» ТП4-ПЦР-01.

Після ампліфікації продукти ПЛР розділяли методом горизонтального електрофорезу в 1,5 % агарозному гелі, який готували, використовуючи ТВЕ буфер з концентрацією 0,5 мг/мл броміду етидію. Результати ПЛР візуалізували УФ променями трансілюмінатора (Т-312-С) і фотографували, використовуючи цифровий фотоапарат «Sony» (DSLR-A500).

Результати дослідження. Використовуючи літературні дані та генетичну базу даних NCBI, здійснювали пошук секвенованих нуклеотидних послідовностей гена, що кодує поліпротеїн Р237 та нуклеотидних послідовностей 3' – некодуючої ділянки РНК-1 з метою проведення біоінформативного аналізу та встановлення консервативних послідовностей РНК-1 ВНПЖБ. У системі генетичної бази даних NCBI зареєстровано 20 нуклеотидних послідовностей фрагментів РНК-1 ВНПЖБ під відповідними номерами із зазначеним ареалом їх походження: EU864117.1 Німеччина, EU330450.1 Німеччина – європейський патотип А, DQ462117.1 Казахстан, D84410.1 Японія, HM126464.1 Франція – патотип Р, EU330453.1 Німеччина – патотип А, DQ462116.1 Казахстан – патотип Р, DQ462115.1 Франція – патотип Р, DQ462114.1 Франція – патотип Р, DQ462113.1 Франція – патотип Р, DQ462112.1 Югославія – патотип А, X05147.1, FJ230959.1 Іран, DQ462111.1 Швеція – патотип А, DQ440509.1 Великобританія, DQ459315.1 Великобританія – патотип Р, FN812746.1 Греція, FN812748.1 Греція, FN812747.1 Греція, AY703452.1 Іран.

Оскільки в генетичному банку даних представлено окремі фрагменти нуклеотидної послідовності геномної РНК-1, біоінфомативний аналіз відбувався з урахуванням кількості аналізованих фрагментів. Вирівнювання послідовностей проводилось окремо для кожної групи фрагментів відповідно геному (1-35 н. – 3 ізоляти, 36-5613 н. – 5 ізолятів, 5614-5631 н. – 11 ізолятів, 5632-5638 н. – 12 ізолятів, 5639-5664 н. – 13 ізолятів, 5665-5981 н. – 14 ізолятів, 5982-5983 н. – 15 ізолятів, 5984-6115 н. – 16 ізолятів, 6116-6169 н. – 19 ізолятів, 6170-6421 н. – 20 ізолятів, 6422-6440 н. – 19 ізолятів, 6441-6552 н. – 18 ізолятів, 6553-6570 н. – 17 ізолятів, 6571-6574 н. – 16 ізолятів, 6575-6587 н. – 13 ізолятів, 6588-6631 н. – 12 ізолятів, 6632-6715 н. – 8 ізолятів, 6716-6719 н. – 7 ізолятів, 6720-6746 н. – 3 ізоляти). На основі аналізу побудовано консенсусну нуклеотидну послідовність повнорозмірної РНК-1 ВНПЖБ (рис.1) і показано консервативні (заглавні літери) та поліморфні (маленькі літери) фрагменти геномної РНК-1 ВНПЖБ. Для подальшого дизайну відповідних праймерів відбирали суворо консервативні фрагменти. Поліморфні ділянки геному виключалися з аналізу. Таким чином забезпечується створення універсальної системи ідентифікації РНК-1 ВНПЖБ всіх існуючих патотипів та можливих ізолятів ВНПЖБ.

Створено дизайн праймерів з оптимальними характеристиками. Для синте-

1–AAATTCGATT CTTCCCATTC GCCATCATTG AATCA 36–TTACT CGTGTACTGG AACGCgGTTA GGAGTGGCTC CAAAGCATCT
TCTTTGAAAA TAGATTGCGA AGTGAGTTCA CCTAAGACGA CGTCGGTGTT TTACGAGTTT TTACATAATC AACATGGCAG ATTCGTTCGG
TTTtACTCCA ATGGAGGTTT TGCTTTTTGG TGGTGAaTCG GTTCAGTTGT TaACTTCAGA CATGCCTATT GATGTCCAGT GGGGCTTTGT
AcACTCcACT CGATGTTATG CTCTCTGGAA AGACGACTTG ATTCATCTCA ATCCGCTGTT GAAATATTCA CAGCGAATTG CAAAACGGTG
GGAAAgGTTA GTTTCGGGCT TTGTTGGCCC AGTACCGCTT GATAAGTTGT TGTCTTTGTT GGCAAAACTT ATGAGGTATT GTGTTAACAT
GGGGGTGTCT GTACAGGAGA TATATTTGTC TGATGCTATT GTTTCATCGT CTTATATGTT GCATGTGTCT AGGAgTGcAG GTTGTGTgTC
TTTTAGTTGG TTGTATGCcA AGcTGTCCAT GTTtGCTTCG TGTGGCAAGT TCTGGGTAGG GTCTTCACAT CACACGGCTG CcAACATGAT
TGAAGGTTCC CGTGCTGTGA ATGGTCCGGA TGTGGCTATT TCTGAGATGG TTGAAGCCTT cCATTTAGAG GTGAAGTCtT CACTCGTTGT
AACTGTaTCT TTGACTCCTA GGGAGAAAAA GATTtTGGAG CGAGAGCtAG GTTTTGTGCC GTTGTACAAA CAGAAAAGTA GAGCTCCACG
cAATCACCCA GTGCTGGCTG CTCTTCGcGA GGTTATGAGG CAGGAGTATT CtGCTAGTTG TAATATTCTT AATACAAAGT TGAAAACACT
GGTAGTTGGT GCTGCCAGTC GTGAAGTTAA TTGTTATTCG TCTAATCCGT CTGTACATTA CTATTTTGCT AATAAAGATA GcAAGGATTT
GGTAAGGACC ACTCTGGAGT TGTTGCATAG cGCTTTGGCT ACAAAGTACC GCAATATGGA AAGTGGTGAG CGAGAACTCA TGAATAATTT
GAAGGGTTGT GGTTATATTG TCAAAAGGTC GGTtGAAAAt GCTgTCTATG AGGTTGTTTC cGATAAAGAT GTTGCcGAAG TGTTAAGGTA
TGCGCAAACT GTCGCTTCAA CGAAGAAAGA GGCGAAAAgG AAACCTAACA CTGGAAAGCG AAAAATGgTC ATGTCGGAAG CAACTCGTAG
AACAATCGAA CTGCATGAGT TGTCGCGTAT TGTAGCCGAA GAGAAGAAGA TTCCTAACCA TTTCCACTTT GATGAAAGtG ATTTTGCTTC
tGTTGGTAAT TTTACTCAGT TGGTTTGTGA AGATGTTGGT TACAATTTTT CTGTGGATGC TTGGTTGCAT TTGTTCGAGG cGACCGGTGC
GCAGACTGCC GTTGGTTATA TGGCATTGCC TAAtGAACTT TTGTTTGAAC ATTATCCAAT ATCAGATTAT TATGATTATT GGGAGGGTGT
TGAAAAGCAT GGTTCATTGG GTGGTATTAC TaTTTCCCCT TTGCGGAATG GACAGGTTGT TGGTATGCCG ACTGGGGTTT TTCAACCTGT
TCATTTTGAC AAGACGTCTG CTGGTTTAGG TATTCCTGGT TCAAAGATGG GTaCTGCTGA ACGTGTTATA TGTCACATGT CAGATGGACT
TGGAAATGGC TACAATCATG TTAAAAGTGA TTGGCAGACG TTGTTGAAAC ATCCTATTTT GTCTTCTTCA AAGTATAATT TTGCTGTTGA
AGTGGATTTA ACGGGACGTT ATGGTTGTCT TGCtACCTTT CGGTTAACTC GTGTGACTGG AGTCAAGTAT GTTGCTAGAA CTATAAAATT
GCGTCCAGAA GATAGGTATG TTCGGGTgTT GGATTTGTTA CATATTGTGC GTAGTATTAG GTTGAAAGGG CATGCCGGtT TGAAAGAACC
aTATCAGTAT TTTCCTGTGT ATAAACGTGA GGTAGATACG aCGGTGTCTT ACTGTTTTTC TATTGCTGAA AAATCGTTGA CAGTACAaAA
CATTGCTAAT TTTATTAGAC ATCAtATTGG TGGTGTTTCT TTAGTTAACA AAGAATTAGT ATCGGCGTGG CGTcTGAATC CaCAACTTGT
TCCTTCGTTC GCATATGCCG TTTACTTTTA TGTTGTTAAT TTGAGAGGTG AGTTGGATGG GATGTTGCAG AAGTTAATGA AAAAGGGTAT
CACATGGGCA GATAGGTTGA AGGCTAATGT TTCAGCGTTT TTGCGAGATA TGGTAGATCC TATTAGTTTT TTGTGGACGT GGTTATTTGA
GAGgAGATTA GTCGATCAAA TTTTTCAGGA TGGGACTGAT GTTTTTTACC AGATGGATCG TGCTTGTGTT gATGAGAAGG CATTGCGTTT
GAACGATCAC ATTAAAATtA CACGAGAcTT TTTGCCTGCT GACACTTTAC TTCCTGAAGG ATGGTCTTTA GACGATTGGG AAAAAGCTCC
CGATAGTTTG AAGACTCTTT CgGCAGCTGC TTCGTTGCCA GTAGAGTGCG GGGCGGTAAA TTGTGTTGGT AAGTCGTTTA AGAGCGTGCG
TACTCTATTA CCACCATCTG TTGTTACTTC ACCTGTTGAG CAGTTTTTCA AATCTGGTGG TAAATTTAGA GATGATGCCG AGTTTGCgGA
ATTGTTGAGT GCGCACTATC GCTGGCAGAT GGACAATTCT TTTGTGCTTT GTCAGGTTTG TGCTGCTTTG ACTGGtAAAA CGGGTTCTCA
AGTTGTTGAA TGCAGATGGA AAGcTGAGTC TATGTATACA TTTTCTATGT CACAAACTGA GGTTGATGAT TTTAGAAATG AGATTAAGGC
TCAATCTATT GAAAAGGGAA ATCGTTTTGG TGAAaTGtTA ATAGGTGTAC ATCAGAAAAT TCCTACACAA GCCTTTGAGG TTTCAGTTCG
ACTCGAATAT GTtAAAGGTG GGCCTGGTAC GGGTAAATCT TTTCTTATAA GATCAtTGGC tGACCCTATc AGGGATCTTG TGGTTGCTCC
GTTCATAAAA TTGCGTTCTG ATTATCAGAA TCAACGAGTT GGTGATGAGC TTCTTTCTTG GGACTTTCAC ACGCCTCACA AAGCATTGGA
TGTTACTGGT AAGCAAATTA TTTTTGTTGA tGAGTTTACA GCCTAtGATT GGCGtTTaCT AGCTGTGTTG GCTTATAGAA ATCATGCCCA
TACTATTTAC TTAGTTGGTG ATGAGCAGCA gACTGGTATT CAAGAGGGTC GTGGAGAAGG AATaTCGATA CTTAACAAAa TTGATcTGTC
TAAGGTTTCT ACACATGTTC CAATCATGAA CTTTAgAAAT CCTGTCCgTG ATGTTAAGGT ATTAAATTAT CTGTTtGGGT CTCGTATGGT
TCCTATGTCT TCCGTTGAAA AGGGATTTAG TTTCGGGGAT aTTAAAGAAT TTTCGTCTTT GTCaAATATC CCAGACACTA AAATCATTCA
TTATTCCGAT GAGACTGGTG AaCATATGAT GCCTGATTAC GTTAGGGGAG TGTCAAAAAC TACTGTCCGT GCTAATCAGG GTAGTACCTA
CGATAATGTT GTTTTGCCTG TTTTaCCATC TGATTTGAAa CTGATTAACT CAGCTGAGTT aAATtTGGTA GCTTTATCTC GTCACAGGAA
TAAGTTAACC ATTTTATTGG ACAATGATGG TATGAATATT GGTGCTGTTT TGAAAGGCAT GCTTGAGGGT GTGCCGGAAG AACTCGAAAG
AAGGGATTAC ATTGTTGGGA TGTACCTTGG GTTACATTTA CCTATTAAGA AAGAGTTCTT CTTTCCTGAG TCTGAGTTTG CTAAgTCGTT
TAGATTAATG GTTGCTAAGT ATGAGGCATT tGTACCTTAC GATAGTgATc TGCCAACTTT GGTTTcACAA GGAGATGTCG TTGTTTTGGA
CATAGCACGT GTGGAAAACG AtATTAATGA TGCCTTTgAT TGTgCAGATT TCTATAATCT TGTGTCTCGT CCTAACAATT GTTTAGTaGT
AGCTATTTCA GAATGTTTAG GTGTGACGCT AGAAAAATTG GACAATCTTA TGCAAGCTAA CGCTGTGACG CTTGATAAGT ATCACGCGTG
GTTGTCTAAG AAGTCTCCAT CAACTTGGCA AGACTGTAGA ATGTTTGCCG ATGCTCTGAA GGTTTCCATG TACGTTAAGG TTTTATCTGA
CAAACCTTAC GATcTAACTT ATGAGGTTGA tGGtGCTGGT TCCTCAGTGA CATTAcATTT AgtTGGTAAG GAAAGCGATG GGCATTTTAT
TGCTGCCCCg CTTAGTcCGT CGCTTTCTAC CAATGAGAGA GAGTCCGGAg ATgATAGTAA GAAACCGGCT GATGATTCTG ACACCTTTGA
TGCTGCTAAT TTGTTTGCTG AtAAGGGTGT TTCTTCCGCT GATATaGAGG CTTTTGTGC CTATTTAGAA AAGACTTTAA TGGCAACAAT
TATGgAGTAT GATTTGAGaT TGCAATCGTG GGCTAATGTG GTTGATGATA CTGACGATTT TTATCAAATt AATATTTCTG AGTTTCGTCA
GTCCACGTGT TTTGGTAAAT TGTTGTCAGC GCTTGAAGTT TTGAAGGTTG ATGTTTCGAG GAAGAgGTTT ATATCTGATT GGTTGTGTAA
AAATCTTGAG AATAaACAAT TCCGGTGGCG TTGGTCTTCT AGTGTGGCTT CAaCTAGTTC GGCCGGGTCG AATGTCGACG ATGATTTTGT
CAATATGGCA GGGGGAAAGA CTGATGCTAA TGtTGATCCT GCTGATGTTT TGAGGCAGAG TTTTATGGAT TATGCATCGG AATTTGTTCC
TATCCTTATC GCTGAATCAC CAATAcTTAT GCCGTTaGTT GAGCCTGAAC CgATATTGTC CAAGTGTATG GTGCCTGAGT TTGACGCcTT
TTTaTTAATA AAGGAATTTG ATTTGGACAA TGGTGCTGAT GAGTATCAAT GCGCTTATCT TAATGAATCT GTTGCTAATC GTgTTGGTGA
CAAATTTGTT TCGGGTGTTT TaGACACTGA TATTATATCT CCATTAAATC TGAGGGGACA TCCTATTGCT GAAAATGTTA AATATCACAG
tATGTGTGTG GCCCCGGCTC AGATATATTT TAAGCGGAAT CAGTGGCAAG AATTaCAGGT TCAACAGGCT CGGTACTTAT TTCGAAAAGT
GAGaAATTCT CCaTCATCGA CACAAGATAG TGTTGCACGT ATGGTTGCTC AGCTATTTGT TTCTGATTGT TTGGTGCCAA AcGTAGCTGA
TACTTTTTCT GCTTCCAATT TGTGGCGAAT TATGGACAAA GCTATGCATG ACATGGTCaC AAAAAATTAt CAAGGaCAAA TGGAAGAGGA
GTTTACGCGT AATGCTAAAt TATATCGTTT TCAGTTGAAG GATATTGAAA AACCtTTGAA GGACCCAGAG ACTGATTTGG CAAAGGCTGG
TCAAGGGATA TTGGCATGGT CTAAGGAGGC ACATGTTAAG TTTATGGTTG CTTTTAGAGT TTTAAATGAT TTGTTATTGA AGTCgTTAAA
CTCTAATGTT GTTTACGATA ACACAATGTC TGAGACCGAA TTT 5614–GTTGGaA AAATAAATGC C 5632–GCCATGA 5639–AT
ATAGTACCGG ATAGTGCTAT AAAC 5665–GGGGTT ATCGATGCTG CTGCTTGCGA TTCTGGGCAA GGGGTTTTTA CCCAATTGAT
AGAAAGACAT ATTTATGCTG CTTTGGGCAT TTCTGACTTC TTTTTGGATT GGTATTTCTC ATTTCGTGAG AAATAtGTTA TGCAGTCCAG
ATATGTCAGA GCACATATGT CTTATGTTAA GACTAGTGGA GAACCcGGCA CTTTGCTTGG TAACACCATT TTAATGGGTG CTATGTTAAA
TGCTATGCTT CGTGGGACCG GACCATTTTG TATGGCCATG AAGGGCGATG ATGGTTTTAA AAGGCAGGCT AATTTGAAAA T 5982–cA
5984–ACGATCA AATGTTAAAG TTGATTAAAA AGGAAACTGT CTTGGATTTC AAATTGGATT TAAATGTTCC TATCACTTTt TGTGGTTATG
CTTTATCTAA TGGACATTTG TTTCCAAGTG TTTCACGTAA aTTGA 6116–CGAAG ATAGCAGCAC ACAGGTTCCG TGAGTATAAG
CATTTTTGTG AATACCAGG 6170–A ATCTTTGCGT GATTGGATTA AAAATCTTCC CAAAGACCCA GCTGTTTATG CTGATTTTTT GGAGTGTAAT
GCTAGCTTAT CTTGTCGCAA TGTTGAtGAT GTtCAACGTT GGTTGGATGC TATTATCTCT GTGTCTCGAA TTGGGCGTGA GCAATTTATG ATGATGTTCC
CGATACGGGA AGTTTTTATG TCATTGCCAC CCGTTGAGGA TAGTTTGGGT GAGtTATCTT CTACGAAAGT GGCTGTGTCT A 6422–TTGGGGACA
ATGTTTCTAA 6441–GTTGTTAGA AAGGTTGCTC GTGTCGATAT GAAAAAGTTT TAATGTGTAA TATAGTAATA TAATACGTTG TATACTTGTG
AGTAGTATAA GTTTGAAAAT GAATAAAGGC CA 6553– TGCCACAG GCCTCCTATC 6571–TTGA 6575–TGAAGG TTGTtGT 6588–GGT
TTTCTCATTA CTGTTTTATT ATTGTTTGAG TTGcTTATGT T 6632–GGTTCTTGA TTATGTGGTG CATAATTATT GAACTAATTG TTTGTTGGGT
TGTaATGTAC TGACTGGGTG TGAATTGTAC CAGTC 6716–gTTA 6720–A AGGGTTTACT ATCAGTATAT TGATAT

Рис. 1. Консенсусна послідовність РНК-1

Таблиця. Молекулярно-біологічні характеристики праймерів для ідентифікації гена Р237 українського ізоляту ВНПЖБ

Ген	Положення на матриці	Нуклеотидна послідовність 5'-3'	Кількість нуклеотидів	Температура відпалу, ^{0}C	GC-склад, %	Розмір продукту, п.н.
P237	Forward Reverse	agcggaatcagtggcaagaa accatcatcgcccttcatgg	20 20	59,96 60,18	50,0 55,0	803

зу було обрано праймери Forward 5'-AGCGGAATCAGTGGCAAGAA-3' та Reverse 5'-ACCATCATCGCCCTTCATGG-3' з назвами відповідно P237-F та P237-R. Розрахункова оптимальна температура відпалу становить для Forward- праймера 59,96 °C, для Reverse-праймера – 60,18 °C, Вміст дезоксигуанозин-5'-фосфату та дезоксицитидин-5'-фосфату складає для Forward- праймера 50%, для Reverse-праймера – 55%, що є оптимальним показником.

Праймер P237-F відпалюється на матриці кДНК в положенні 5153–5172 н., праймер P237-R – в положенні 5936–5955 н. відповідно (рис. 2). Очікуваний розмір продукту ампліфікації становить 803 пари нуклеотидів.

Рис. 2. Локалізація ділянок гібридизації праймерів на ДНК матриці консенсусної послідовності гену Р237 ВНПЖБ

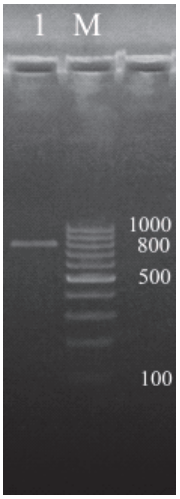

Рис. 3. Електрофореграма продукту ПЛР аналізу визначення РНК-1 ВНПЖБ: 1 – РНК-1, M (GeneRuler 10 bp DNA Lader 0241) – маркер довжин фрагментів (пар нуклеотидів)

Полімеразну ланцюгову реакцію проводили з використанням кДНК українського ізоляту ВНПЖБ за таких умов: початкова денатурація 5 хв – 94 °C; 30 циклів: денатурація 30 с – 94 0С, відпал праймерів 30 с – 60 °C, елонгація 30 с – 72 °C; заключний синтез 72 °C – 7 хв.

В результаті візуалізації ПЛР продуктів ампліфікації виявлено фрагменти розміром 803 пари нуклеотидів. Наявність на електрофореграмі очікуваного продукту реакції свідчить, що розроблена система ідентифікації РНК-1 ВНПЖБ є ефективною (рис. 3). На наступному етапі нашого дослідження підбирались робочі температури відпалу праймерів.

Проводили серію реакцій з різними температурними режимами відпалу праймерів від 50 до 64 °С. ПЛР проводили за наступних умов: початкова денатурація 5 хв – 94 °С; 20 циклів: денатурація 30 с – 94 °С, відпал праймерів 30 с – 50–64 °С, елонгація 30 с – 72 °С, заключний синтез 72 °С – 7 хв. Хоча температурний режим відпалу праймерів на ефективність реакції ампліфікації суттєво не впливав, було встановлено, що більш оптимальна температура знаходиться в межах 50–60 °С. За цих умов неспецифічних продуктів ампліфікації не спостерігалося, а кількість ампліконів була достатньою для чіткої візуалізації в агарозному гелі (рис. 4).

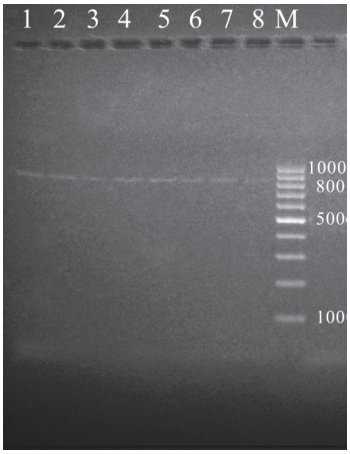

Рис. 4. Електрофореграма оптимізації температури відпалу праймерів для ідентифікації гена P 237: 1 – 50 °С, 2 –52 °С, 3– 54 °С, 4 – 56 °С, 5 – 58 °С, 6 – 60 °С, 7 – 62 °С, 8 – 64 °С, M (GeneRuler 10 bp DNA Lader 0241) – маркер довжин фрагментів (пар нуклеотидів)

Висновки

Біоінформативний аналіз нуклеотидних послідовностей РНК-1 ізолятів вірусу некротичного пожовтіння жилок буряку показав консервативні послідовності гена, який кодує протеїн Р237 ВНПЖБ, що дало можливість здійснити дизайн праймерів для ідентифікації РНК-1: Forward 5'-AGCGGAATCAGTGGCAAGAA-3' та Reverse 5'-ACCATCATCGCCCTTCATGG-3'. Оптимізовано систему ідентифікації РНК-1 за температурними показниками відпалу праймерів і доведено, що оптимальна температура знаходиться в межах 50–60 °С. В подальших дослідженнях планується провести визначення нуклеотидної послідовності РНК-1 протеїну Р237 та встановити філогенетичні зв'язки з наявними у світі ізолятами.

Література

1. Canova A. Appunti di patologia della barbabietola // Inf. Fitopatol. – 1959 – 20. – P. 390 – 396.
2. Evidence for in vitro and in vivo autocatalytic processing of the primary translation product of beet necrotic yellow vein virus RNA-1 by a papain-like proteinase / Hehn A., Fritsch C., Richards K. E. et al. // Archives of Virology. – 1997. –142 – P. 1051 – 1058.
3. Nucleotide sequence of beet necrotic yellow vein virus RNA-1 / Bouzoubaa S., Quillet L., Guilley H. et al. // Journal of General Virology. – 1987. – 68. – P. 615 –626.
4. Rush C. M. Ecology and epidemiology of benyviruses and plasmodiophorid vectors / C. M. Rush // Annu Rev Phytopath. – 2003. – 41– P. 567 – 592.
5. Virus Taxonomy: The Classification and Nomenclature of Viruses / C. M. Fauquet, M. A. Mayo, J. Maniloff et al. – San Diego, CA. USA: Elsevier Academic Press, 2005. – P. 1162.
6. Multiple sequence alignment by Florence Corpet [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/.
7. National Center for Biotechnology Information [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed.
8. Primer3web version 4.0.0 - Pick primers from a DNA sequence. [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: http://primer3.ut.ee/.

АННОТАЦИЯ

Гринчук Е. В., Антипов И. А. *Разработка молекулярно-биологической системы для идентификации РНК-1 украинского изолята вируса некротического пожелтения жилок свеклы // Биоресурсы и природопользование. – 2015. – **7**, 1–2. – С. 12–17.*

Проведен биоинформативный анализ нуклеотидных последовательностей РНК-1 изолятов вируса некротического пожелтения жилок свеклы. Показаны консервативные последовательности гена, который кодирует протеин Р237 этого вируса и разработан дизайн праймеров для идентификации его РНК-1. Оптимизирована ПЦР-система идентификации РНК-1 по температурным показателям отжига праймеров.

SUMMARY

K. Grynchuk, I. Antipov. *The development of molecular-biological system for the identification of RNA-1 of ukrainian isolate of beet necrotic yellow vein virus // Biological Resources and Nature Management. – 2015. – **7**, 1–2. – P. 12–17.*

The bio-informative analysis of the nucleotide sequences of RNA-1 of isolates of beet necrotic yellow vein was made. The conserved sequences of a gene that encodes a protein P237 have been shown. Primers design for identification of RNA-1 has been made. The PCR system for RNA-1 identification was optimized by temperature rates of primer annealing.