

**НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І
ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ**

Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології

ДОПУСКАЄТЬСЯ ДО ЗАХИСТУ

Завідувач кафедри екобіотехнології та
біорізноманіття

_____ Олена КВАСКО

«___» _____ 2025 р.

БАКАЛАВРСЬКА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

**на тему «Розробка генетично-молекулярних методів детекції вірусу опіку
лохини (*Carlavirus vaccinii*)»**

Спеціальність 162 «біотехнології та біоінженерія»

Гарант освітньої програми

Кандидат біологічних наук,
доцент, завідувач кафедри
екобіотехнології та
біорізноманіття

_____ Олена КВАСКО

Керівник бакалаврської кваліфікаційної роботи

Кандидат біологічних наук,
доцент кафедри екобіотехнології
та біорізноманіття

_____ Олександр СУБІН

Виконала

_____ Катерина КУЛИК

КИЇВ – 2025

**НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І
ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ**

Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

екобіотехнології та біорізноманіття

к.б.н., доцент _____ Олена КВАСКО

« ____ » _____ 2025р.

З А В Д А Н Н Я

на виконання бакалаврської кваліфікаційної роботи студентці

Кулик Катерина Вадимівна

Спеціальність 162 «біотехнології та біоінженерія»

Тема бакалаврської кваліфікаційної роботи «Розробка генетично-молекулярних методів детекції вірусу опіку лохини (*Carlavirus vaccinii*)»

затверджена наказом ректора НУБіП України від “22” жовтня 2024р. №1880С

Термін подання завершеної роботи (проекту) на кафедру 15 травня 2025 року

Вихідні дані до бакалаврської кваліфікаційної роботи: нуклеотидні послідовності гена, що кодує білок оболонки, позитивні контролю вірусу опіку лохини.

Перелік питань, які потрібно розробити:

1. Провести аналіз літературних джерел про вірус опіку лохини та його молекулярно-генетичні особливості.
2. Провести біоінформативний аналіз ізолятів *Carlavirus vaccinii*.
3. Розробити праймери для *Carlavirus vaccinii*.
4. Експериментально перевірити специфічність та роботу розроблених праймерів.

Дата видачі завдання 4 вересня 2024 року

Керівник бакалаврської

кваліфікаційної роботи

Олександр СУБІН

Завдання прийняла до

виконання

Катерина КУЛИК

Реферат

Подана бакалаврська кваліфікаційна робота складається із вступу, 3 розділів, висновків, списку використаної літератури, який включає 23 джерела. Робота викладена на 40 сторінках комп'ютерного тексту і включає 8 рисунків та 2 таблиці.

Об'єкт досліджень: молекулярно-генетична детекція вірусу опіку лохини *Carlavirus vaccinii*.

Мета досліджень: дослідження особливостей геному вірусу опіку лохини, ефективних способів діагностики цього вірусу, підбір та оптимізація праймерів для проведення полімеразної ланцюгової реакції у режимі реального часу.

Предмет дослідження: нуклеотидні послідовності, що кодують капсидний білок *Carlavirus vaccinii*.

На основі отриманих результатів досліджень можна проводити молекулярно-генетичну діагностику вірусу *Carlavirus vaccinii*. Це посприє зменшенню його негативного впливу на цінні сільськогосподарські культури, а також дозволить ефективніше визначати оптимальний час для проведення діагностики.

Ключові слова: вірус опіку лохини, *Carlavirus vaccinii*, полімеразна ланцюгова реакція, ЗТ-ПЛР, дизайн вироджених праймерів, електрофорез.

ЗМІСТ

ВСТУП	7
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	9
Молекулярні характеристики роду <i>Carlavirus</i>	9
Молекулярна характеристика вірусу опіку лохини (Blueberry scorch virus/ <i>Carlavirus vaccinii</i>)	11
Симптоматика Blueberry scorch virus	12
Методи діагностики	14
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ	19
Виділення РНК з рослинного матеріалу	19
Проведення ПЛР	21
Аналіз результатів методом електрофорезу	21
РОЗДІЛ 3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА	23
Біоінформативний аналіз нуклеотидних послідовностей гену білка оболонки вірусу опіку лохини (<i>Carlavirus vaccinii</i>).....	23
Дизайн праймерів для детекції вірусу опіку лохини (<i>Carlavirus vaccinii</i>) методом одностадійної ЗТ-ПЛР	30
Перевірка специфічності праймерів для проведення одностадійної ЗТ-ПЛР	32
Порівняння з іншими вірусами роду <i>Carlavirus</i>	35
ВИСНОВКИ	37
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	38

СПИСОК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ПЛР	полімеразна ланцюгова реакція
РНК	рибонуклеїнова кислота
mРНК	матрична РНК
vRNA	вірусна РНК
BlScV	вірус опіку лохини (Blueberry scorch virus)
NCBI	National Center of Biotechnology Information
ORF	відкрита рамка зчитування
ICTV	всесвітній комітет таксономії вірусів
RdRp	РНК-залежна РНК-полімераза
ДНК	дезоксирибонуклеїнова кислота
кДа	кілоДальтон
kb	кілобаз
CP	капсидний білок
qPCR	ПЛР у реальному часі/кількісна ПЛР
EtBr	бромистий етидій
dNTP	дезоксинуклеотид трифосфат(-и)

ВСТУП

Carlavirus vaccinii (BIScV) – це вірус, що уражає культурні сорти лохини, зокрема лохини високорослої (*Vaccinium corymbosum*). Вірус виражається в'яненням квітів, некрозом листя, відмиранням верхівок пагонів, що призводить до зниження врожайності рослини та проблем з її комерційним виробництвом.

Звертаючись до Держстату України, бачимо наступну статистику даних: за 2022 рік Україна виробила 123,3 тис. тонн ягід, з них, зокрема, лохини – 1,8 тис. тонн. Також варто зазначити, що експорт лохини у сезон 2024 року склав 5 тис. тонн, а це на 1,3 тис. тонн більше, ніж у 2023 році. Тобто, експорт лохини зріс на 33%. У грошовому еквіваленті експорт склав 26 млн [22].

Ці дані характеризують лохину як актуальну для вирощування в Україні культуру. Такі плантації приносять хороший прибуток та добре експортуються, якщо рослини здорові та вирощуються у відповідних умовах для оптимізації отримання продукції.

Проте, ураження рослини вірусом може значно нашкодити прибуткам та якості продукції, тож мінімізація та боротьба із зараженням мають бути серед найважливіших пріоритетів фермерів.

Вірус легко передається через заражений посадковий матеріал, а також за допомогою комах-переносників (наприклад, попелиць). Це підвищує ризик стрімкого поширення проблеми. Рання діагностика вірусу дозволяє вжити ефективних заходів для локалізації та запобіганню подальшого поширення інфекції. Сучасні методи діагностики, такі як ПЛР дозволяють з високою точністю виявити присутність вірусу навіть при мінімальних симптомах, хоч і дослідження цього вірусу і його методи діагностики ще не так добре вивчені, що є ще однією причиною для зосередження на дослідженнях у цій сфері. Ефективне управління вірусом можливе лише за умови застосування сучасних діагностичних методів та постійного моніторингу насаджень.

Завдання дипломної роботи полягає в оптимізації параметрів для проведення дослідів із постановкою ПЛР та ЗТ-ПЛР для ідентифікації обраного вірусу, скринінгу вже відомих рослин-господарів з наявною симптоматикою вірусів на наявний позитивний контроль та дослідження молекулярно-біологічних особливостей діагностики, дизайн вироджених олігонуклеотидних праймерів для створення ПЛР-тест-систем, які дадуть змогу оптимізувати час детекції та зроблять можливим проведення перманентного скринінгу можливих рослин-переносників вірусу.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Молекулярні характеристики роду *Carlavirus*

Карлавірус (англ. *Carlavirus*) був раніше відомим як група латентних вірусів гвоздики (англ. *Carnation latent virus group*) – рід вірусів, що належить до родини *Betaflexiviridae*. Складається з п'ятдесяти двох видів, включно з латентним вірусом гвоздики. Уперше рід був описаний у каталозі Міжнародного комітету з таксономії вірусів (МКТВ/ICTV) у 1971 році як група латентних вірусів гвоздики, але був перейменований у 1975 році як рід *Carlavirus*. У 2005 році він був віднесений у родину *Flexiviridae* (раніше був не класифікованим). Однак на сьогодні поточна позиція роду від 2009р у родині *Betaflexiviridae*, що таксономічно відноситься до *Flexiviridae* [5,15].

Вірусам цього роду притаманна цитоплазматична реплікація. Реплікація геномних РНК цих вірусів здійснюється за моделлю реплікації позитивно спрямованих одноланцюгових РНК-вірусів. Лінійний одноланцюговий ssRNA(+) геном складається з 5,8 – 9 тис. нуклеотидів. 3'-кінцева ділянка поліаденільована, а в деяких родах 5'-кінець має кеп-структуру. Кодує від трьох до шести білків. РНК-зв'язувальний білок – RNB (екзорибонуклеаза). Інфекційна вірусна РНК виконує як функції геному, так і вірусної матричної РНК. Інші відкриті рамки зчитування (ORFs) ймовірно транскрибуються у вигляді моноцистронних субгеномних мРНК (sgRNAs) [14].

Згідно з реєстром ICTV рід *Carlavirus* налічує вісімдесят вісім видів вірусів. Більшість видів передаються природнім шляхом через попелиць у ненаполегливий (non-persistent) спосіб. Усі вони можуть передаватися механічно, але деякі (наприклад, *Carnation latent virus* та *PVS*) мають достатню інфекційність аби поширюватись таким чином у полях [3].

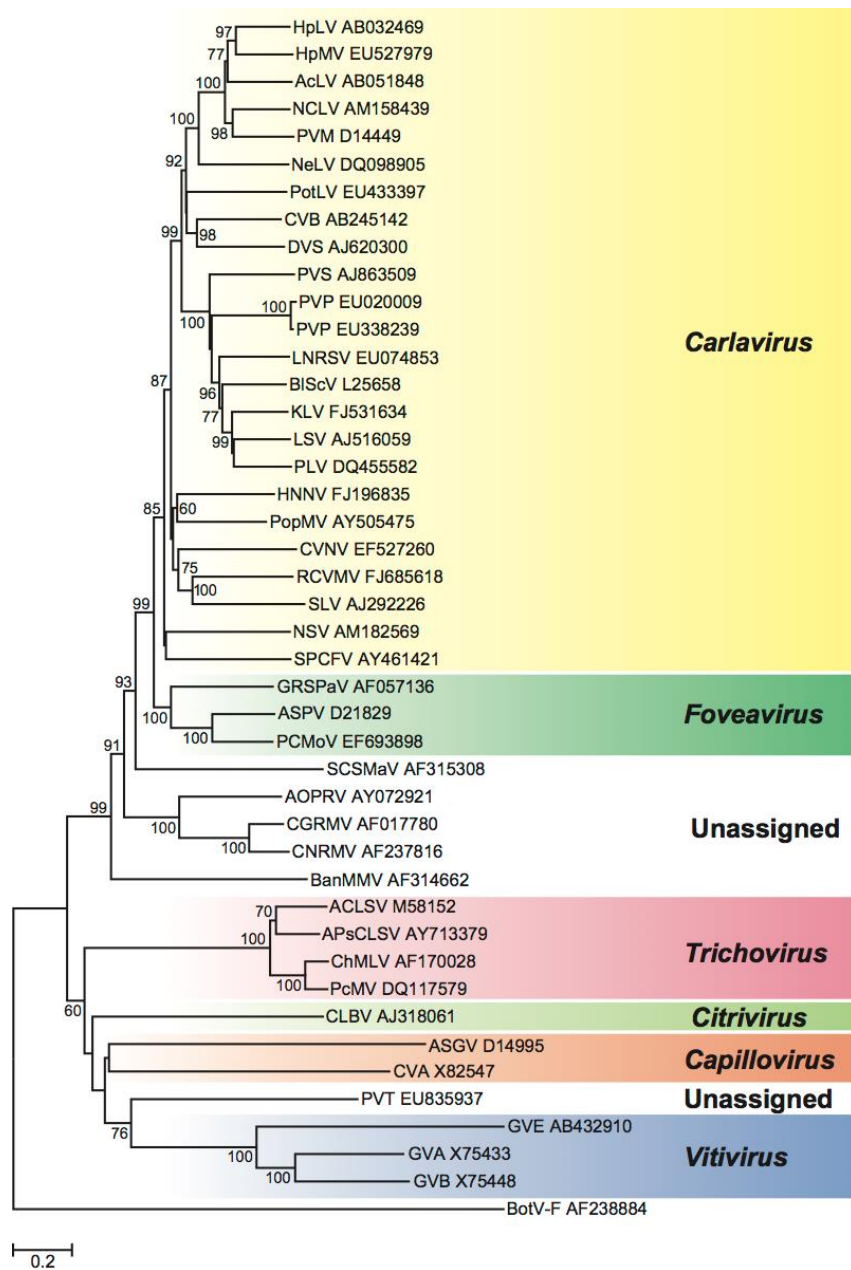


Рисунок 1. Філогенетичне дерево *Betaflexiviridae* [3]

Філогенетичне дерево *Betaflexiviridae* побудоване на основі амінокислотних послідовностей усього білка реплікації представників родини. У дерево включено по одному ізоляту від кожного секвенованого виду цієї родини, а коренем слугує *Botrytis virus F* (*BotV-F*; рід *Mycoflexivirus*, родина *Gammaflexiviridae*). Числа на гілках вказують відсоток підтримки бутстреп-аналізу із 1000 реплікацій. Шкала відображає амінокислотні відстані за моделлю JTT. Дерево побудовано в MEGA4 [3].

Географічне поширення багатьох видів є обмеженим, але ті, що інфікують вегетативні культури, зазвичай мають більш широкий ареал, ймовірно, через ненавмисне розповсюдження разом із вегетативним матеріалом. Більшість видів поширені в помірному кліматі, тоді як *CPMMV* (вірус м'якої плямистості вігні) поширений лише в тропічних і субтропічних регіонах [15].

Діапазон хазяїв кожного виду досить специфічний, різні види не заражають інші рослини перехресно. Вони легко розрізняються за допомогою серологічних методів. Штами одного виду часто можна відрізнити за реакцією з поліклональними антитілами, а ще точніше – з моноклональними. Окремі види мають менше ніж 72% нуклеотидної подібності, або ж менше ніж 80% амінокислотної подібності між генами капсидного білка або полімерази [3].

1.2. Молекулярна характеристика вірусу опіку лохини (*Blueberry scorch virus/Carlavirus vaccinii*)

Вірус опіку лохини, або ж Sheep Pen Hill disease вперше був ідентифікований у 2000 році в долині Фрейзера, Британська Колумбія, Канада. Там він уражав сорти лохини високорослої, яка є важливим комерційним продуктом [4]. Згодом вірус почав поширювати і у Європі також, наприклад, влітку 2004 року ряд рослин з посівного поля чорниці в П'ємонті (Костільоле Салуццо, провінція Кунео) показали симптоми, які зазвичай пов'язують із вірусом опіку лохини [19].

BlScV є членом групи карлавірусів, родини Flexiviridae. Він складається з однієї молекули лінійної, позитивно спрямованої ssRNA розміром приблизно 8,5 кб. Геном має шість відкритих рамок зчитування (ORFs), 5 кеп-ділянок (ймовірно) та 3'-полі(А) послідовність [4]. Віріони представляють собою гнучкі палички розміром 610-700 нм та діаметром 12-15 нм.

ORF1 кодує білок масою 223кДа, що являє собою передбачувану репліказу та містить домени метилтрансферази, NTP-зв'язувальний сайт, геліказу та RdRp. ORF2, ORF3 ТА ORF4 перекриваються з утворенням так званого «потрійного

генного блоку» (ТГВ), що є характерним для карлавірусів. Зокрема, ORF2 (5520-5990) кодує білок масою 17-25кДа, гомологічний геліказі. ORF3 (5990-7102) є передбачуваним білком зчитувального зсуву рамки зчитування капсидного білка (CPFS). Вважається, що ORF3 експресується шляхом зсуву рамки зчитування на -1 нуклеотидній позиції 5960 геномної РНК. ORF4 – основний білок масою 7кДа. ORF5 кодує капсидний білок масою 33-44 кДа, що є передбачуваним білком рухомості, тоді як ORF6, що з ним перекривається, кодує цистеїн багатий білок-супресор РНК-інтерференції [14,4,19]. ORF1 у тому числі кодує вірусну репліказу (nt 106-5433) з передбачуваною молекулярною масою 200 кДа. Ця ділянка також містить три консервативні домени: домен вірусної метилтрансферази (положення амінокислот 286-470), домен вірусної гелікази 1 (675-902) та центральний мотив RdRb (1377-1696).

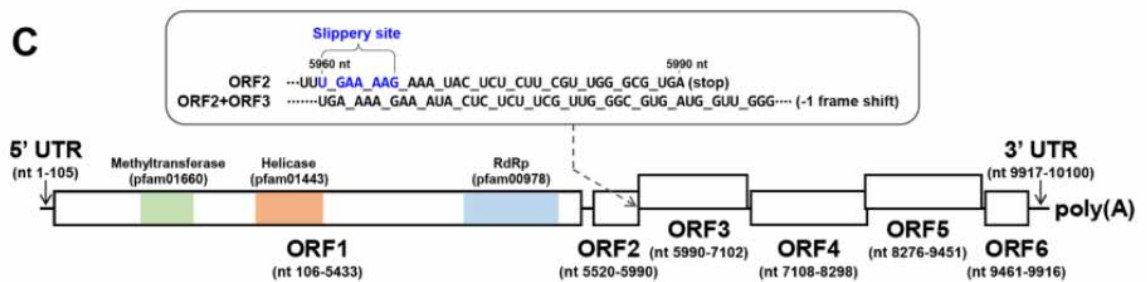


Рисунок 2. Приблизна організація геному з 6-ма рамками зчитування [21]

1.3. Симптоматика зараження вірусу опіку лохини

Симптоми зараження вірусом опіку лохини проявляються не одразу, а лише після латентного періоду в 1-2 роки після зараження. Часто вірус проявляється швидким в'яненням квітів та їх опаданням під час раннього цвітіння, тож це може бути найбільш вдалим періодом для діагностики. Іноді лише окремі пагони виявляють симптоми інфікування і можуть розташовуватись поруч із повністю здоровими на вигляд рослинами. Проте, вірус поширюється на всі частини лохини, включно із кореневою системою. Якщо інфіковану рослину скосяти, ті

паростки, що вийдуть із зараженого кореневища, також будуть інфікованими. Рослини поступово втрачають свою продуктивність, слабшають та відмирають, навіть якщо замість інфікованих рослин вирости нові та здорові на перший погляд [12].

Серед інших симптомів вірусу також є поява червоних ліній на листках рослини. Восени – пожовтіння країв листя, мозаїчність забарвлення, загальне збліднення рослини, зменшення кількості квіток або навіть кущуватий вигляд. До зараження сприятливі усі сорти рослини, але залежно від випадку симптоми можуть бути більш чи менш видимі. Наприклад, сорти Bluecrop, Bluegold, Lateblue, Duke, Coville, Concord, Puru, Nui, Bluetta майже не виявляють симптомів, хіба що хвора рослина може бути дещо блідішою у порівнянні зі здоровою особиною, але рослини цього сорту не будуть в'янути чи відмирати. Втім, незважаючи на це, рослини Bluecrop все одно мають менший врожай та дрібніші плоди при інфікуванні [12,16].

Симптоми вірусного опіку на лохині можуть бути подібними до проявів інших хвороб та ушкоджень, наприклад, вірусного шоку лохини, моніліального опіку, бактеріального опіку, пошкоджень гусеницями або наслідком заморозків. Тому для точного визначення збудника хвороби, що спричинив симптоми, потрібна діагностика у спеціалізованій лабораторії.



Рисунок 3. Симптоми ураження рослин лохини вірусом опіку лохини (Blueberry scorch virus). Ранні та пізні стадії в'янення квіток (A-D), в'янення листя (E), а також симптоматична рослина серед безсимптомних у полі, інфікованому вірусом опіку лохини (F). Фото: Ліза Вегенер, Політехнічний університет Квантлен, Британська Колумбія [12]

1.4. Методи діагностики

На сьогоднішній день для детекції вірусу опіку лохини найчастіше використовують імуносорбентний аналіз із подвійним антитілом за схемою «сендвіч» (DAS-ELISA).

Імуносорбентний аналіз (ELISA) – це метод імунної діагностики, який використовують для визначення білків, антитіл чи антигенів у біологічних

зразках. Цей метод працює на засадах імунної відповіді організму на подразник, тобто, високоспецифічної реакції «антиген-антитіло». Спочатку відбувається іммобілізація антигену чи антитіла на планшет із лунками, який опісля промивається. Далі на планшеті розміщують дослідний зразок, знову промивають. Додають другорядні антитіла, зв'язані з ензимом та субстрат, потрібний для реакції. Результат досліджують із допомогою спектрофотометра [10].

DAS-ELISA, або ж імуносорбентний аналіз типу «сендвіч» це високочутливий та високоспецифічний метод ІФА при якому використовуються два антитіла. Таку назву цей тип дістав через те, що при проведенні аналізу антиген «затиснутий» між двома антитілами. Через наявність двох антитіл стає можливим розпізнавання різних епітопів на антигені [10,8].

Цей метод також є найдешевшим та економічно вигідним, але має й недоліки: симптоми проявляються лише через 1-2 роки, а також рослині потрібен час на синтез потрібних антитіл. Тож діагностика за допомогою імуносорбентного аналізу потребує багато часу, що може нести як економічні збитки, так і дати вірусу час та можливість сильніше розповсюдитись.

Вчені Мартін та МакДональд дослідили різні варіанти можливих буферів для проведення тесту й дійшли висновку, що найкращим екстрагуючим буфером є буфер, що містить 0,5% нікотину. Він був необхідним для підтримання рівня рН гомогенатів листя лохини вище 5,0, що є критично важливим показником для проведення DAS-ELISA. Найкраще для такого дослідження використовувати старші листки чи квіти рослини. Зразки вважаються позитивними, якщо значення оптичної густини удвічі перевищують середнє значення негативних контролів. Ідентифікація вірусу цим методом можлива за концентрації 1 нг/мл [23].

Через те, що використання імуносорбентного аналізу виявилось недостатньо ефективним, у 1995 році Хальперн та Хільман розробили протокол для детекції вірусу опіку лохини з використанням ПЛР у реальному часі. Через наявність фенольних сполук та інших інгібуючих речовин у лохині екстракція

нуклеїнових кислот виявилась дещо важим завданням, ніж планувалось. Поєднання екстракції з використанням хлориду літію (LiCl) або гліциново-фенольного методу з подальшим очищенням за допомогою міні колонки Elutip-r перед зворотною транскрипцією стабільно забезпечувало вірусну РНК (vRNA) належної чистоти для детекції методом qPLR у зразках листкової та квіткової тканин [23].

Метод ПЛР у реальному часі дозволяє ампліфікувати вірусну РНК навіть на ранніх стадіях інфекції, тож він є більш специфічним та чутливим у порівнянні із ELISA-методом. Проте, полімеразна ланцюгова реакція потребує специфічних праймерів для діагностики вірусу. Отримані продукти ПЛР аналізуються методом агарозного гель-електрофорезу з використанням етидіум-броміду або SYBR Green. Для підвищення точності діагностики може використовуватись qRT-PCR з флуоресцентними зондами, що дозволяє кількісно оцінити рівень вірусної інфекції [20].

В основі методу полімеразної ланцюгової реакції лежить ензиматична ампліфікація специфічних нуклеотидних послідовностей чи локусів з використанням термостабільної Taq-полімерази та олігонуклеотидних праймерів. Теоретично кількість копій після кожного циклу збільшується вдвічі, але варто також враховувати можливі пошкодження чи втрати деяких фрагментів. За допомогою цього методу можна отримати у 10^8 - 10^9 разів більше копій досліджуваного фрагменту ДНК чи РНК. Це значно полегшує їх візуальну детекцію. У 1974 році цей метод був описаний як альтернативний спосіб хімічного синтезу генів вченими Панетом і Кораною. Проте, саме у класичному значенні ПЛР була описана 1985 року К. Мюллісом. За це він згодом отримав Нобелівську премію у 1993 [17].

Процес ампліфікації складається з послідовних повторів циклів денатурації ДНК, відпаду праймерів та синтезу нового комплементарного ланцюга. Спочатку у ролі основного ферменту реакції використовували фрагмент полімерази *E. coli*, але цей фермент є термолабільним, тож потребує поновлення

після кожного циклу. Згодом, дослідивши бактерію *Thermus aquaticus*, що є термостабільною, вдалось виділити таку ж термостабільну полімераза (Taq). Це значно спростило процес ампліфікації та дало змогу автоматизувати його [11,6].

Для проведення реакції потрібні наступні компоненти: дистильована деіонізована вода, dNTPs, прямі та зворотні праймери, ДНК-полімераза (Taq), буфер, хлорид магнію $MgCl_2$ і досліджуваний зразок ДНК/РНК [11].

ПЛР у реальному часі, або ж qPCR є сайт-специфічним видом ПЛР. Це означає, що така реакція проводиться за умов наявності попередньо визначених фрагментів ДНК чи РНК з відомою геномною локалізацією. Особливістю цього виду ПЛР є можливість вести моніторинг кінетики накопичення ампліконів у кожному циклі в реальному часі. Для детекції продуктів ампліфікації використовують флуоресцентні барвники. Вони виконують репортерну флуоресценцію, що прямопропорційна кількості продукту [23,7].

Концентрацію РНК вимірюють за допомогою спектрофотометра при довжині хвилі 260нм. Максимум поглинання ароматичних кілець нуклеїнових кислот – 255-260нм. Перед вимірюванням препарат розбавляють у 100-500 разів в окремому епендорфі.

У 2023 році американська компанія Adgia Inc., що спеціалізується на діагностиці патогенів рослин з 1981 року, розробила новий ізотермічний молекулярний тест AmplifyRP XRT для виявлення вірусу опіку лохини навіть у польових умовах. Тест забезпечив високу точність, чутливість та швидкість отримання результатів. З використанням таких тест систем діагностика вірусу можлива ще на ранніх стадіях, тож не поступається в ефективності стандартній ПЛР. Крім того, AmplifyRP не потребує попереднього виділення РНК, що робить тест значно зручнішим у використанні [2].

Також важливу роль у розробці діагностики патогенів важливу роль відіграють методи *in silico*. Для досліджень генетичних фрагментів, теоретичного випробовування тест-систем та праймерів використовуються спеціальні

програмні забезпечення, здатні аналізувати та обробляти інформацію із доволі специфічних сфер. Часто для таких цілей використовуються програми, як от: MEGA, Geneious Prime, MAFFT, Primer 3, CoVprimer, In silico PCR, тощо. З їх допомогою стає можливим множинне вирівнювання, утворення консенсусних послідовностей, дизайн та тестування праймерів, оцінка їх специфічності, передбачення утворення продуктів ампліфікації. Такі інструменти для роботи із генами значно покращують темпи розвитку як біоінформатики, так і роблять значний внесок в оптимізацію детекції нових патогенів [13].

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

2.1. Виділення РНК із рослинного матеріалу

Буфери та стокові розчини:

0,1% DEPC-water на 1000 мл: 1 мл DEPC-реагенту; 1000мл Mili-Q-water; розмішати на магнітній мішалці до повного розчинення реагенту, залишити на змішуванні протягом ночі. Автоклавувати при 121°C протягом 15 хв.

1M TRIS-HCl на 1000 мл: 121,14 г TRIS-HCl; 800 мл 0,1% DEPC-water; pH 8,0; довести об'єм до 1000 мл 0,1% DEPC-water, зберігати при кімнатній температурі.

0,5M EDTA на 1000 мл: 186,1 г EDTA; 800 мл 0,1% DEPC-water; pH 8,0 5M NaOH; довести об'єм до 1000 мл 0,1% DEPC-water, зберігати при кімнатній температурі.

20% SDS на 100 мл: 20 г SDS розчинити у 80 мл 0,1% DEPC-water; змішувати на нагрівальному блоці при 60°C до повного розчинення; довести об'єм до 100 мл 0,1% DEPC-water, зберігати при кімнатній температурі.

3M NaAc на 100 мл: 24,6 г NaAc розчинити у 50 мл 0,1% DEPC-water; pH 4,0 (1M HCl); довести об'єм до 100 мл 0,1% DEPC-water, зберігати при кімнатній температурі.

Фенол:хлороформ:ізоаміл (25:24:1) на 50 мл: 25 мл фенолу; 24 мл хлороформу; 1 мл ізоамілового спирту; змішувати безпосередньо перед проведенням реакції.

Буфер для екстракції РНК 100 мл:

- 10 мл 1M TRIS-HCl
- 5 мл 0,5M EDTA
- 2,5 г PVP
- 14,61 г NaCl

- Розчинити при нагріванні до 40°C
- Долити об'єм до 97,5 мл 0,1% DEPC-water або деіонізованою водою
- Автоклавувати при 121°C протягом 15 хв
- Додати 2,5 мл меркапетанолу перед початком екстракції

Додаткові реагенти: PVP, NaCl, LiCl, хлороформ.

Етапи виділення:

1. Підготувати необхідні реактиви; обробити та, за потреби, простерилізувати необхідні витратні матеріали
2. Відібрати необхідну кількість мікропробірок на 1,5 мл та промаркувати
3. Гомогенізувати рослинний матеріал у ступці (100 мг), додавши 600 мкл буферу для екстракції РНК. Отриманий гомогенат перенести в мікропробірки
4. Додати 60 мкл 20% SDS; перемішати на вортексі та центрифугувати при 16 тис.об/хв протягом 5 хв
5. Відібрати верхню водну фазу у нові мікропробірки
6. Додати 1 об'єм суміші фенол:хлороформ:ізоаміловий спирт (25:24:1); перемішати на вортексі та центрифугувати при 16 тис.об/хв протягом 5 хв
7. Відібрати верхню водну фазу у нові мікропробірки
8. Додати 200 мкл хлороформу; перемішати на вортексі та центрифугувати при 16 тис.об/хв протягом 5 хв
9. Перенести верхню водну фазу у нові мікропробірки
10. Додати 160 мкл 8М LiCl та 60 мкл 3М NaAc; інкубувати протягом 15 хвилин при -20°C; центрифугувати при 16 тис.об/хв протягом 5 хв
11. Видалити супернатант та промити осад 2М LiCl; центрифугувати при 16 тис.об/хв протягом 5 хв
12. Видалити супернатант та додати охолоджений 80% етанол для промивання осаду; центрифугувати при 16 тис.об/хв протягом 5 хв

13.Видалити супернатант та висушити осад за RT

14.Додати 100 мкл деіонізованої води або 0,1% DEPC-water.

2.1. Проведення ПЛР

Для проведення досліду знадобилось наступне устаткування: ламінарний бокс безпеки другого класу, ампліфікатор, набір автоматичних дозаторів з регуляцію об'єму (самплерів), одноразові наконечники, епендорфи на 0,2 та 0,5мл, лабораторний халат та нітрилові рукавички.

Для досліду відібрали 7 пробірок з урахуванням позитивного та негативного контролів, підписали їх. Ввімкнули та налаштували ампліфікатор під параметри, наведені нижче у таблиці 1. Пробірки із досліджуваним матеріалом помістили в ампліфікатор та запустили апарат.

Таблиця 1

Етап	Температура, С	Час, хв	К-сть циклів
Початкова денатурація	95	10	1
Денатурація	95	0,5	40
Відпал праймерів	54	0,5	
Елонгація	72	0,5	
Кінцева елонгація	72	7	1

Після завершення усіх циклів продукти реакції перенесли на агарозний гель для подальшого проведення електрофорезу та аналізу.

2.2. Аналіз результатів методом електрофорезу

Для аналізу результатів було проведено електрофорез на агарозному гелі, для якого знадобились: лабораторні ваги, підігрівач, камера для горизонтального електрофорезу, трансільюмінатор, самплери, засоби індивідуального захисту.

Також були використані наступні реактиви: порошок агару, TBE буфер, маркер довжин фрагментів ДНК, досліджувані зразки, EtBr.

Для приготування гелю для електрофорезу на 100мл 1X TBE буфера зважили 1,5г агарози, підігріли перемішуючи до повного її розчинення. Залишили охолонути декілька хвилин, після чого ввели EtBr та знову перемішали. Залили розчин на спеціальний столик та залишили гель застигати.

Опісля, коли гель став твердим, залили буфер у камеру та внесли в лунки досліджуваний матеріал (гель має бути під буфером), внутрішні контролю виділення РНК, ДНК маркер. Результати опрацьовують та візуалізують за допомогою УФ.

Якщо результат позитивний – смужки форефу відповідають розміру прогнозованих фрагментів.

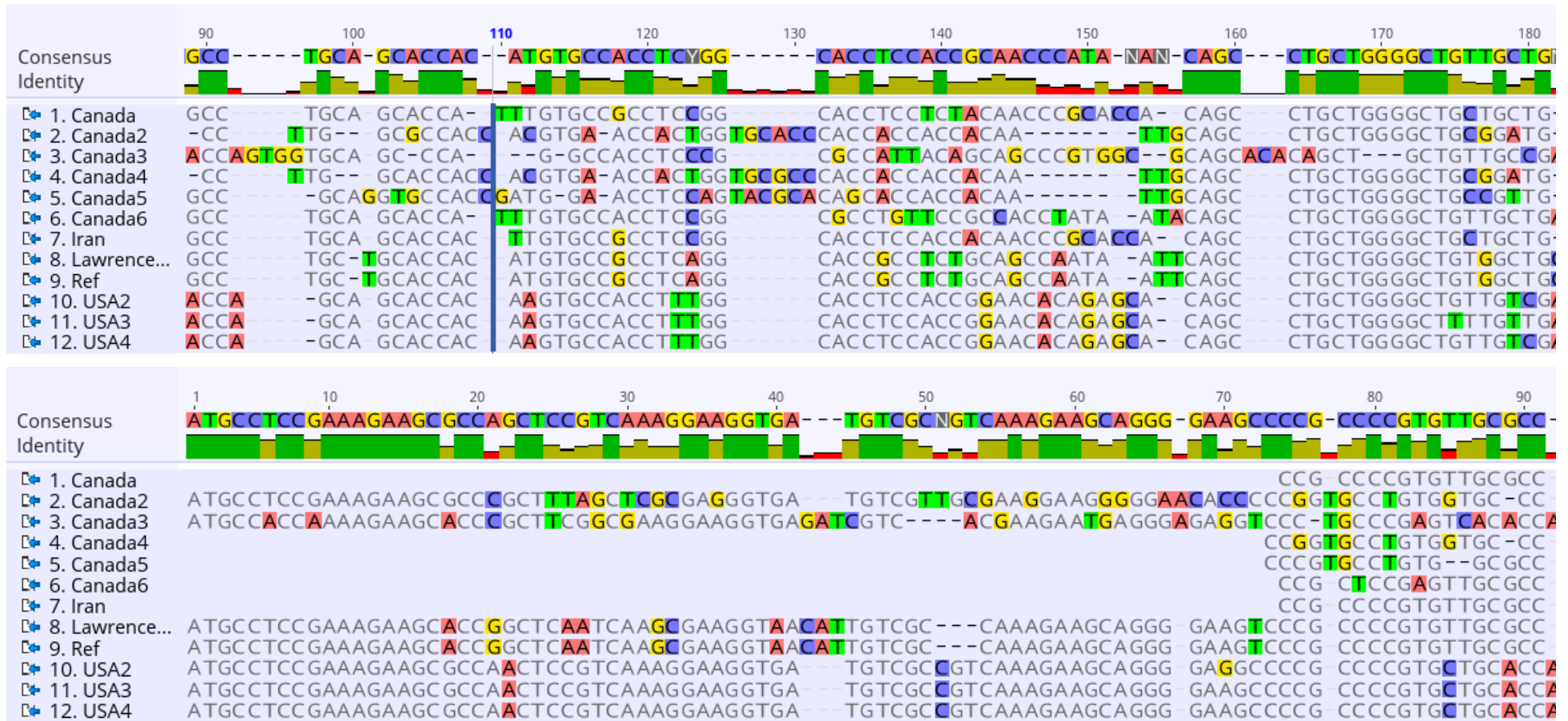
Якщо смужок навпроти позитивного контролю немає – потрібно проводити дослід наново від етапу виділення РНК.

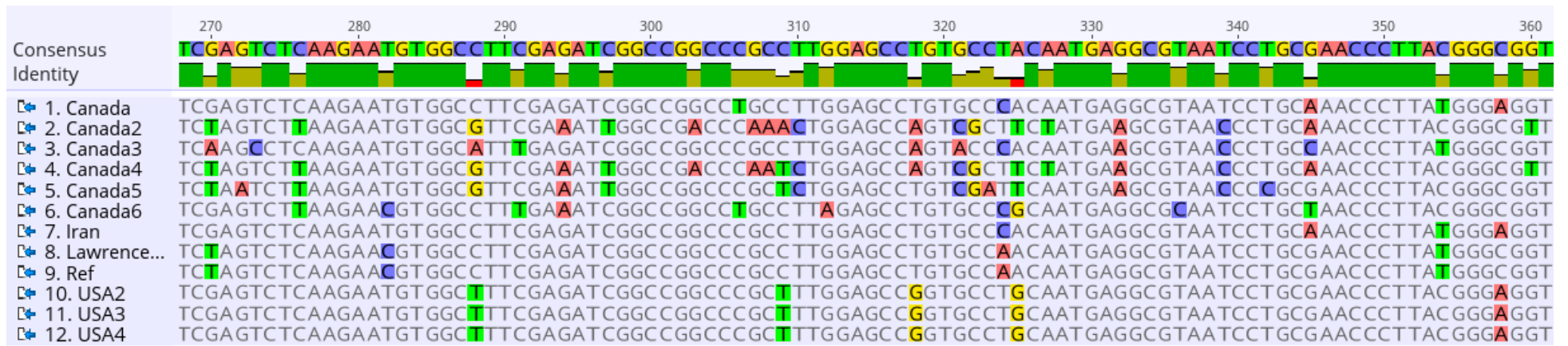
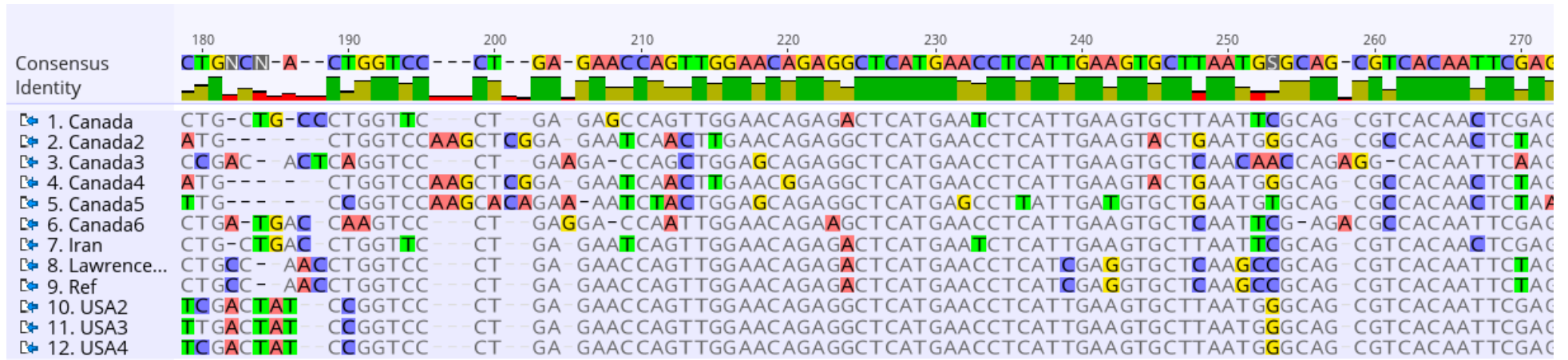
РОЗДІЛ 3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

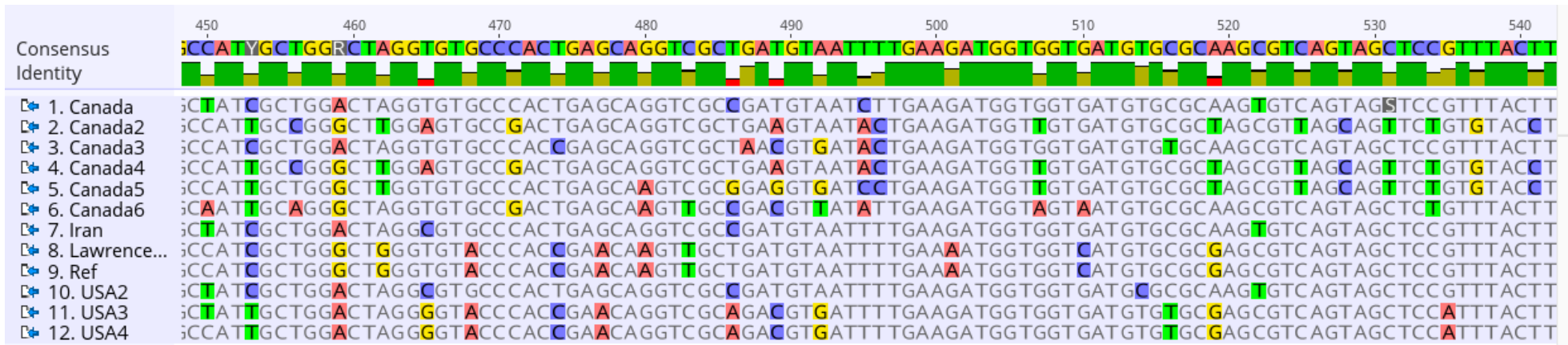
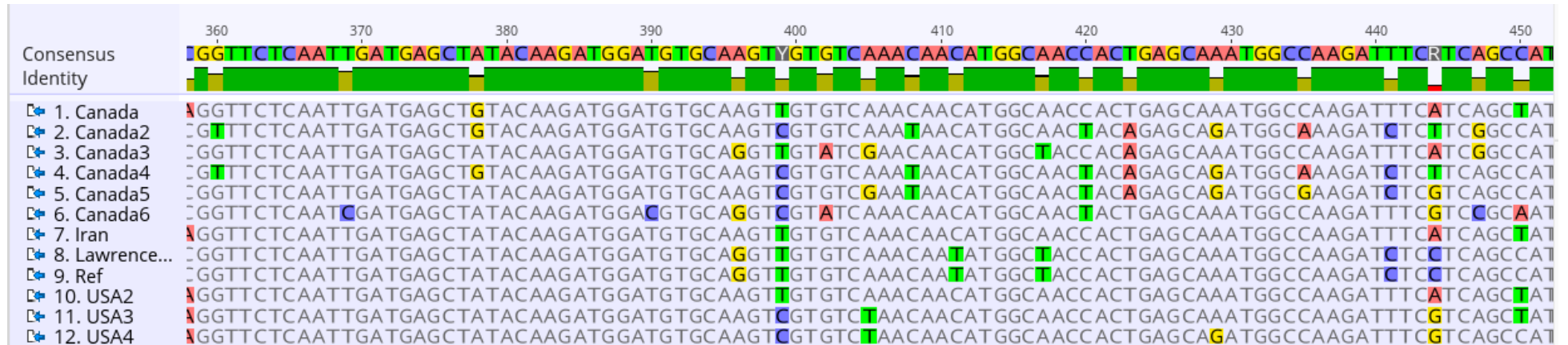
3.1. Біоінформативний аналіз нуклеотидних послідовностей, гену білка оболонки вірусу опіку лохини (*Carlavirus vaccinii*)

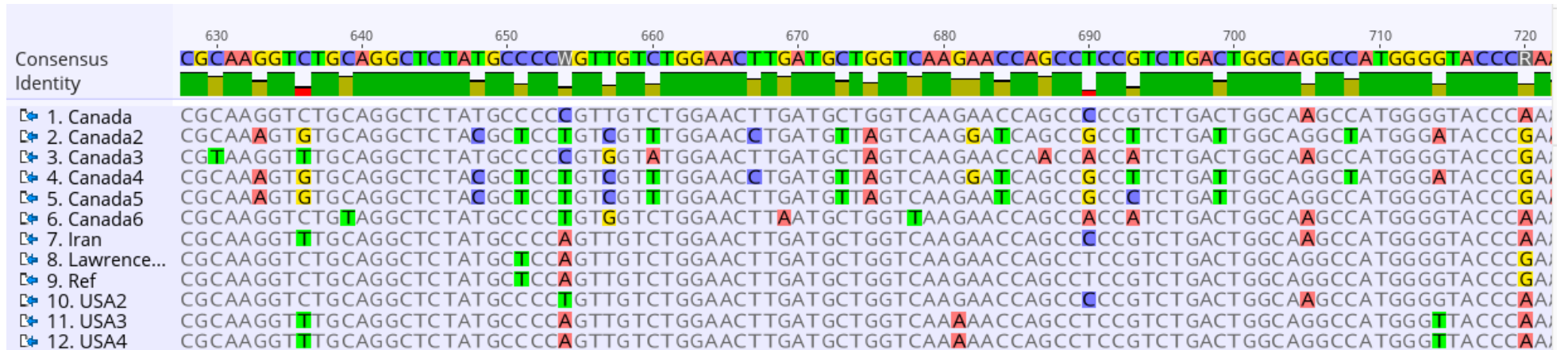
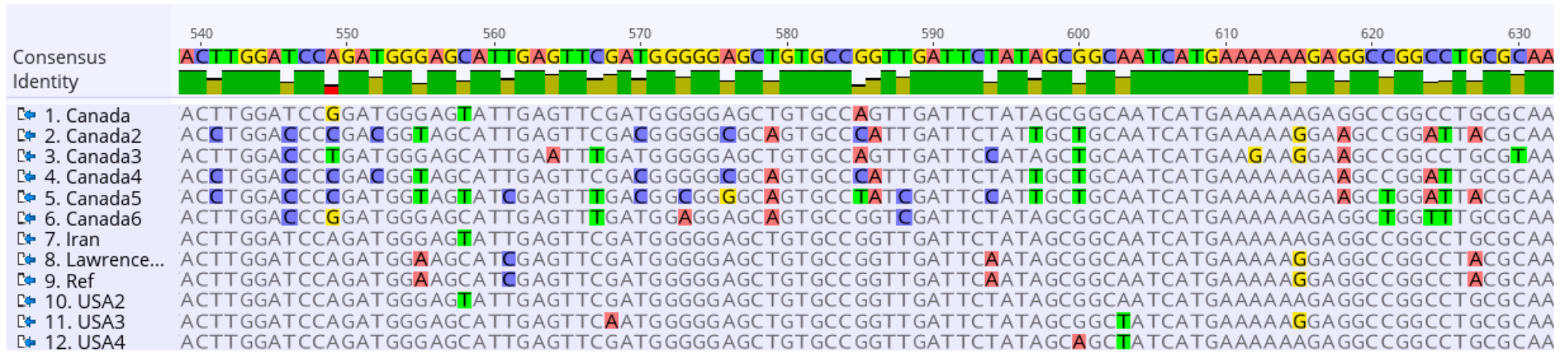
Враховуючи те, що вірус опіку лохини набув світового поширення, то першим етапом наших досліджень було проведення біоінформативного аналізу нуклеотидних послідовностей гену, що кодує білок оболонки *Carlavirus vaccinii* для визначення консервативних ділянок з метою запобігання отримання хибнонегативних результатів у зв'язку з неспецифічністю праймерів або внутрішньовидовим/внутрішньоштамовим поліморфізмом. Дизайн праймерів має відповідати наступним заданим вимогам: по-перше, характеристика праймерів повинна бути оптимальною для постановки одностадійної ЗТ-ПЛР; по-друге, праймери мають бути строго специфічними до нуклеотидних послідовностей капсиду *Carlavirus vaccinii*. За використання бази даних Національного центру біотехнологічної інформації США (NCBI), було опрацьовано дані нуклеотидних послідовностей, що кодують білок оболонки вірусу опіку лохини. Для подальшої роботи було відібрано 12 нуклеотидних послідовностей капсиду вірусу опіку лохини, зокрема, референс-послідовність (NC_003499.1), ізоляти з Канади (DQ266467.1, AY941199.1, OK558636.1, DQ266466.1, DQ266464.1, DQ266456.1), Ірану (MH411658.1), США (KP232986.1, KP232990.1, KP232997.1) [17].

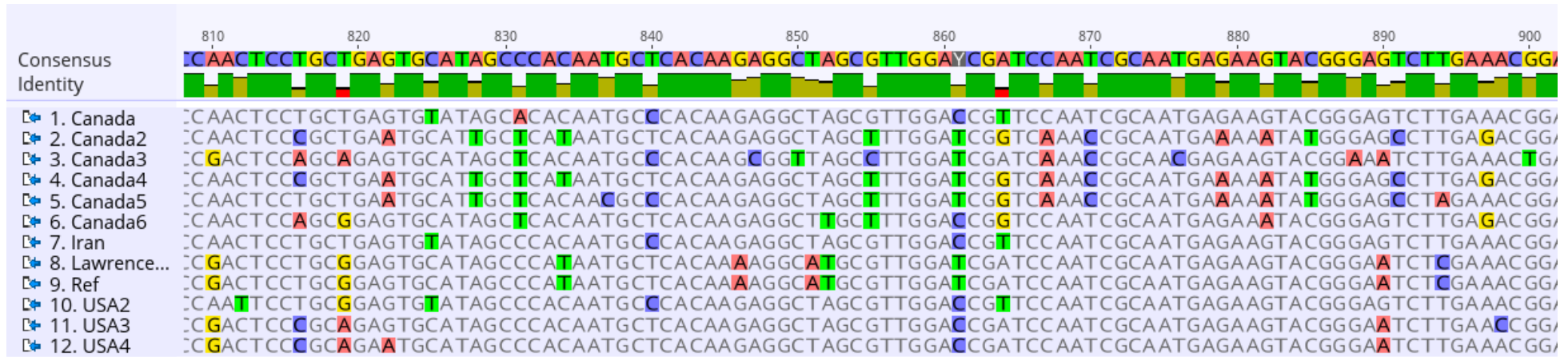
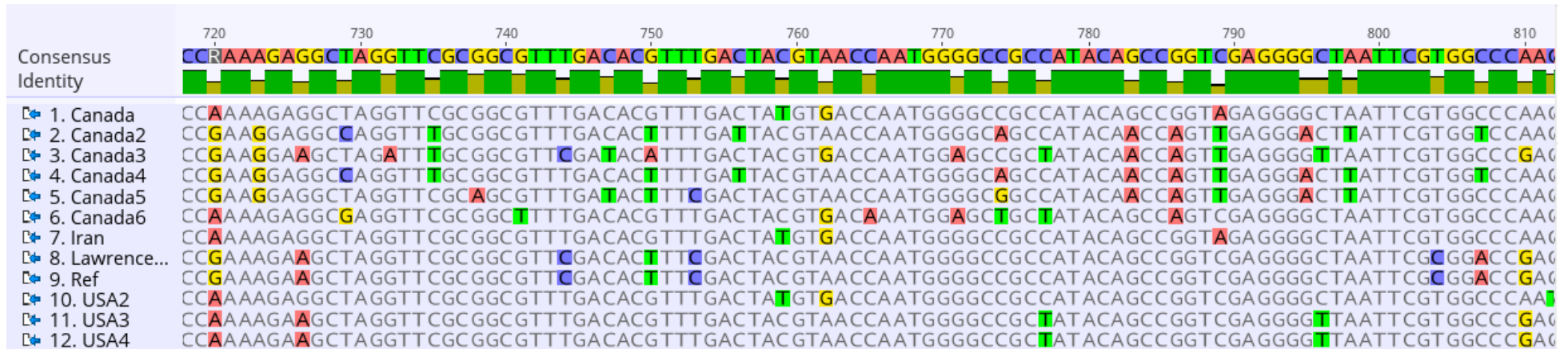
Використовуючи програмне забезпечення Geneious Prime було проведено MSA-аналіз (множинне вирівнювання послідовностей) для вирівнювання, порівняння та пошуку висококонсервативних ділянок нуклеотидних послідовностей, що кодують капсид вірусу опіку лохини (рис.4). Пошук таких ділянок є необхідною передумовою для дизайну праймерів та конструювання сучасних тест-систем для ПЛР діагностики, які дозволять проводити найточнішу детекцію.











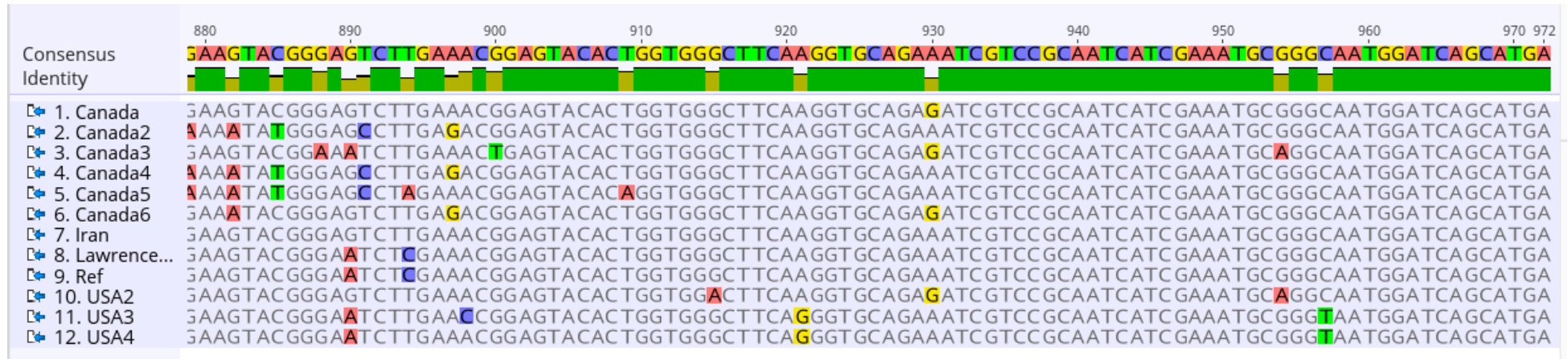


Рис. 4. MSA-аналіз нуклеотидних послідовностей, що кодують білок оболонки *Carlavirus vaccinii*: 1-6 – ізоляти з Канади DQ266467.1, AY941199.1, OK558636.1, DQ266466.1, DQ266464.1, DQ266456.1; 7 – ізолят з Ірану MH411658.1; 9 – референсний сиквенс NC_003499.1; 10-12 – ізоляти із США KP232986.1, KP232990.1, KP232997.1

За результатами MSA-аналізу нами одержано консервативну послідовність, яка використана в якості матриці для дизайну праймерів одностадійної ЗТ-ПЛР (Рис. 5).

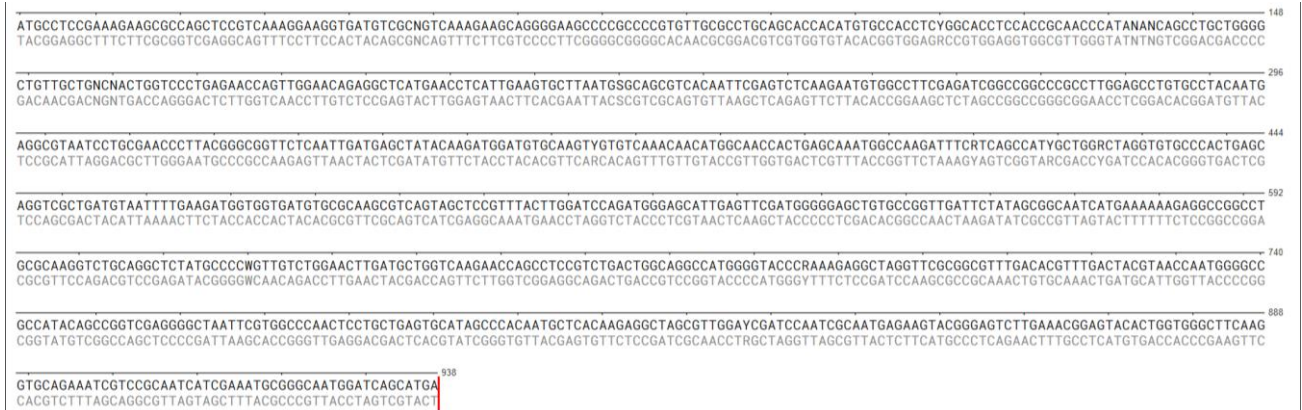


Рис.5. Консенсусна послідовність нуклеотидів, що кодують білок оболонки *Carlavirus vaccinii*, зеленим позначено місце відпалу праймерів

3.2. Дизайн праймерів для детекції вірусу опіку лохини (*Carlavirus vaccinii*) методом одностадійної ЗТ-ПЛР

За допомогою модуля Primer 3, програмного забезпечення Geneious Prime на основі отриманої консенсусної послідовності *Carlavirus vaccinii* нами було згенеровано 3 пари праймерів, які повинні відповідати наступним вимогам:

- Довжина: 15-25 нуклеотидів;
- Вміст ГЦ: 40-65%;
- 5'-кінець праймера: 1-2 пуринові основи;
- 3'-кінець праймера: 1-2 пуринові основи, без полі-Г/полі-Ц кінця;
- Температура плавлення: 55-75С;
- Температура відпалу: 55-65С;
- Праймер не має накладатись на вторинні структури із вищою температурою плавлення;
- Не має утворюватися сайт-мішеней із вищою температурою плавлення, ніж температура плавлення праймера;
- Комплементарність: близька до 100%;
- Подібність з іншими ділянками: менше 70%.

За проведеної роботи нами було розроблено праймери, нуклеотидні послідовності, термодинамічні показники та молекулярні розміри теоретично розрахованих продуктів ампліфікації наведено у таблиці

Таблиця 2.

Порівняльна характеристика утворених праймерів

№	Назва	Нуклеотидна послідовність	Довжина, нкл	ГЦ склад, %	Тм, С	Шпильки, С	Димери, С	Розмір продукту
1	216F	GAACAGAGGCT CATGAA	17	47,1	50,6	-	18,3	683
2	899R1	GTTTCAAGACT CCCGTA	17	47,1	50,2	-	-	683
3	230F	GAACCTCATTG AAGTGC	17	47,1	50,1	-	-	659
4	899R2	TCCCGTACTTCT CATTG	17	47,1	49,9	-	-	659
5	319F	ACGGGCGGTTC TCAATTGAT	20	50	60	-	9	567
6	885R	GAAGCCCACCA GTGTA CTCC	20	60	60	-	-	567

Згенеровані праймери мали різну температуру плавлення в діапазоні 50-60°C, GC-склад коливався в діапазоні 47-60%, розмір продукту був від 567 до 683 п.н.



Рис.6. Локалізація праймерів 319F-885R на консенсусній послідовності вірусу опіку лохини (*Carlavirus vaccinii*)

3.3 Перевірка специфічності праймерів для проведення одностадійної ЗТ-ПЛР

Розроблені нами праймери були перевірені експериментально. Для перевірки праймерів використовувалися позитивні контролі вірусу опіку лохини виробництва Agdia, США та DMSZ, Німеччина. ПЛР проводили на ампліфікаторі «CFX96» (Biorad, США) у наступному температурному режимі: для **216F-899R1** та **230F-899R2** 45хв за 42°C – зворотна транскрипція; 10 хв за 95°C – початкова денатурація ДНК; 40 циклів: 0:30 с за 95°C – денатурація ДНК, 0:30 с. при 48C – відпал праймерів, 45 с при 72C – елонгація ДНК; 7 хв при 72C – фінальна елонгація ДНК. Для праймерів **319F-885R** 45 хв при 42C – зворотна транскрипція; 10хв при 95C – початкова денатурація ДНК; 40 циклів: 0:30 с при 95C – денатурація ДНК, 0:30 с при 58C – відпал праймерів, 45 с за 72C – елонгація ДНК; 7 хв за 72C – фінальна елонгація ДНК.

Реакційна суміш об'ємом 25 мкл містила: Зворотню транскриптазу у/мкл; DTT, 100mM; рендом-праймери та полі-Т праймери; 2ч One Taq Quick-Load Master-mix with SB (20mM Tris-HCl (pH 8.9), 22mM KCl, 22mM NH₄Cl, 1.8 mM MgCl₂, 0.2 mM dATP, 0.2 mM dCTP, 0.2 mM dGTP, 0.2 mM dTTP, 5% гліцерол, 0.06% IGEPAL CA-630, 0.05% Tween 20, 1x Xylene cyanol, 1x Tartrazine, 25

units/ml OneTaq DNA Polymerase) – 12,5 мкл, по 0,2мкМ прямого та зворотного праймерів (2 мкл кожного), 10-50 нг РНК та 6,5 мкл деіонізованої води.

Оскільки пара праймерів **216F-811R1** та **230F-899R2** мали температуру плавлення 50С, то за умов проведення ПЛР спостерігалось крім утворення специфічного продукту ампліфікації розміром 120-140 пн (Рис. 7) у зразку з позитивним контролем *Agia* (50 нг). З позитивним зразком DMSZ за вихідної концентрації РНК 50 нг, утворення неспецифічного продукту не спостерігалось. Пара праймерів 230F-899R2 взагалі не утворювала продукт ампліфікації з позитивним зразком DMSZ (50 нг), проте утворювала специфічний продукт розміром 659 п.н. з позитивним контролем *Agia* (50 нг). Окрім того, варто зазначити, що жодна з пар праймерів не утворювала продукт ампліфікації зі зразком інфікованої рослини із симптомами *Carlavirus vaccinii*. Тому дані варіанти праймерів недоцільно використовувати для молекулярно-генетичної діагностики вірусу опіку лохини.

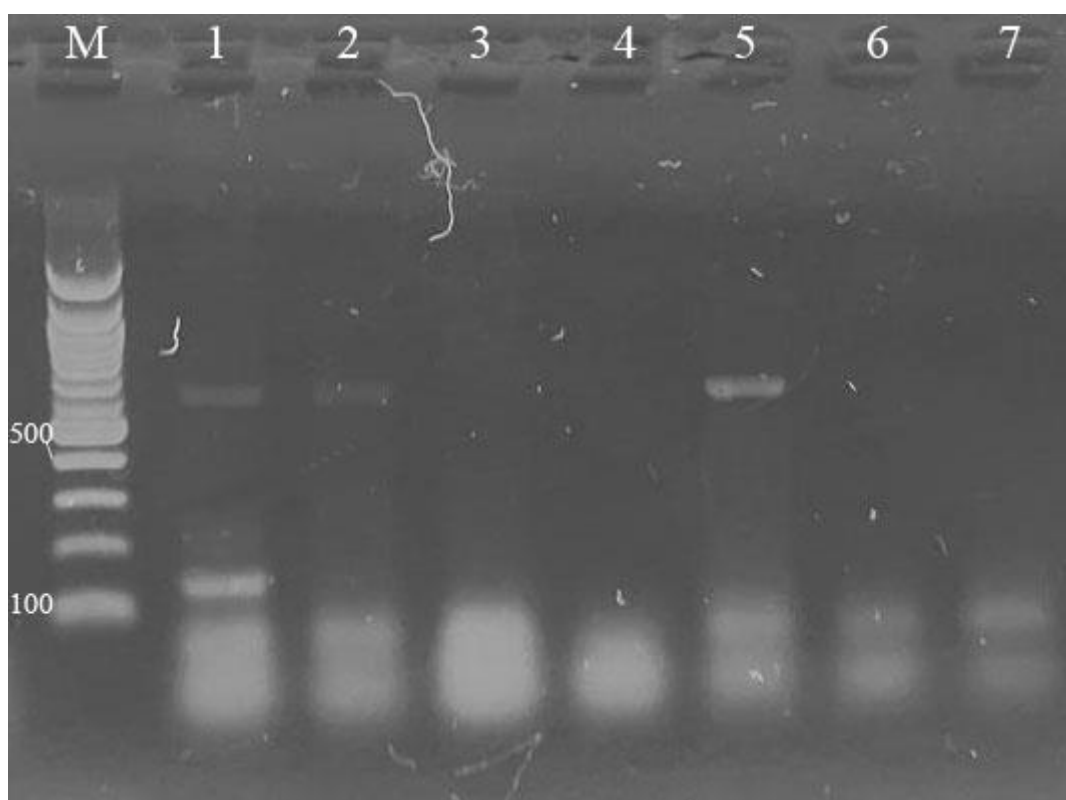


Рис. 7. Електрофореграма продуктів ампліфікації із розробленими праймерами (1-3 праймери 216F-899R1; 4-6 праймери 230F-899R2): М- маркер молекулярних мас; 1 - 50 нг позитивний контроль *Agdia*; 2 - 50 нг позитивний контроль

DMSZ; 3 - інфікована рослина із симптомами Carlavirus vaccinii; 4 – 50 нг позитивний контроль DMSZ; 5 – 50 нг позитивний контроль Agdia; 6 – інфікована рослина із симптомами Carlavirus vaccinii; 7 – негативний контроль.

На відміну від праймерів 216F-899R1 та 230F-899R2, пара праймерів 319F-885R характеризувалися вищою температурою плавлення. За використання даної пари праймерів спостерігалось утворення специфічного продукту ампліфікації розміром 567 п.н. у зразку із позитивним контролем Agdia (10 та 50 нг). Також аналогічний продукт утворювався зі зразками інфікованої рослини із симптомами вірусу опіку лохини. При цьому продукт ампліфікації не утворювався в зразку з РНК латентного вірусу хмелю (*Carlavirus latenshumuli*). Крім того, відсутні будь-які неспецифічні продукти ампліфікації та вторинні структури.

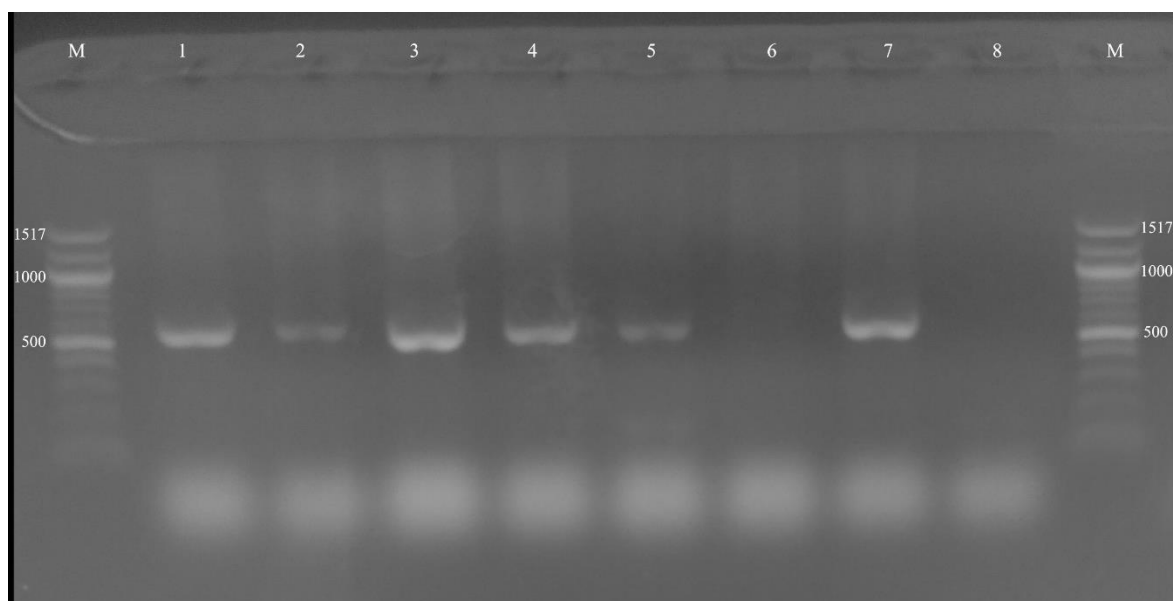


Рис. 8. Електрофореграма продуктів ампліфікації з розробленими праймерами 319F-855R: М - маркер молекулярних мас; 1 - 50 нг позитивний контроль Agdia; 2 - 10 нг позитивний контроль Adgia; 3 - 50 нг позитивний контроль DMSZ; 4 – 10 нг позитивний контроль DMSZ; 5 – інфікована рослина із симптомами Carlavirus vaccinii 10 нг; 6 – 50 нг позитивний контроль Carlavirus latenshumuli; 7 – інфікована рослина із симптомами Carlavirus vaccinii 50 нг; 8 – негативний контроль

За результатами експериментальних даних пара праймерів 319F-855R є специфічною до гена, білка капсиду вірусу опіку лохини (*Carlavirus vaccinii*),

утворює специфічний продукт ампліфікації розміром 567 п.н. з позитивними контролюями даного вірусу різного географічного походження, а також ідентифікує український ізолят. Тому дана пара праймерів може застосовуватися для ідентифікації вірусу опіку лохини (*Carlavirus vaccinii*) методом одностадійної ЗТ-ПЛР.

3.3. Порівняння з іншими видами роду *Carlavirus*

Для оцінки генетичної різноманітності та дослідження потенційної специфічності розроблених нами праймерів, було проведено порівняльний аналіз нуклеотидних послідовностей гену капсидного білка CP вірусу опіку лохини з аналогічними послідовностями інших представників роду *Carlavirus*, отриманих із бази даних NCBI. Відбір 19 послідовностей базувався на критеріях подібності рослини-господаря до лохини та поширеності вірусів. До аналізу були включені: *Cowpea mild mottle virus* (CPMMV), *Elderberry carlavirus C* (ELCV-C), *Elderberry carlavirus D* (ELCV-D), *Elderberry carlavirus E* (ELCV-E), *Hop latent virus* (HLV), *Hop mosaic virus* (HMV), *Lingustrum virus A* (LVA), *Potato virus M* (PVM), *Shallot latent virus* (SLV) та *Strawberry pseudo mild yellow edge virus* (SPMYEV).

Порівняння консенсусної та референсної послідовностей B1ScV з відібраними геномами інших карлавірусів здійснювалося за допомогою програмного забезпечення Geneious Prime шляхом MSA-вирівнювання з метою пошуку консервативних ділянок.

Результати загального множинного вирівнювання видів показали відносно низький рівень подібності між досліджуваними видами роду *Carlavirus*, що не перевищував 60%. Було ідентифіковано 867 (43,2%) подібних нуклеотидних сайтів та 57,4% подібності між парами нуклеотидів. Це свідчить про значну розбіжність та генетичну різноманітність у досліджуваних геномів. Отримані дані також підтверджують гіпотезу про те, що розроблені праймери для B1ScV будуть специфічні саме для цього представника роду *Carlavirus* та його виявлення у лохині.

Проведений філогенетичний аналіз вказує на значну генетичну різноманітність у межах досліджуваного роду. Найбільшу подібність до вірусу опіку лохини BLScV показав M вірус картоплі (76,6%), у той час як найменшу подібність виявили віруси бузини (55,5% у середньому). Результати вказують на помірний рівень консервативності гену капсидного білка в межах роду, що допускає значні варіації у взаємодії з рослинами-господарями та, як наслідок, у потенційній специфічності розроблених праймерів для вірусу опіку лохини.

ВИСНОВКИ

1. Досліджено один з найменш досліджених вірусів сортових культур лохини *Carlavirus vaccinii*, його шкоду для рослини та бізнесу.
2. Проведено біоінформативний аналіз капсидного білка B1ScV та його гомологію із іншими вірусами роду, а саме: Cowpea mild mottle virus (CPMMV), Elderberry carlavirus C (EICV-C), Elderberry carlavirus D (EICV-D), Elderberry carlavirus E (EICV-E), Hop latent virus (HLV), Hop mosaic virus (HMV), Ligustrum virus A (LVA), Potato virus M (PVM), Shallot latent virus (SLV), Strawberry pseudo mild yellow edge virus (SPMYEV).
3. Створено пару вироджених праймерів, специфічних саме для вірусу опіку лохини: 319F (5`-3`) ACGGGCGGTTCTCAATTGAT та 885R (3`-5`) GAAGCCCACCAGTGTACTCC.
4. Експериментально протестовано згенеровану пару праймерів та виявлено їхню специфічність стосовно цільового вірусу у реакції ампліфікації.
5. Перевірено експериментально використання згенерованих праймерів для постановки qPCR.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Adams, M. J.; Antoniw, J. F.; Bar-Joseph, M.; Brunt, A. A.; Candresse, T.; Foster, G. D.; Martelli, G. P.; Milne, R. G.; Fauquet, C. M. (2 травня 2004). Virology Division News: The new plant virus family Flexiviridae and assessment of molecular criteria for species demarcation. *Archives of Virology*. 149 (5): 1045—60.
2. Agdia Inc. (2023). New molecular test for Blueberry Scorch Virus using AmplifyRP® XRT platform. [Online Resource]. <https://www.agdia.com/company/news/1768754/agdia-launches-new-blscv-rapid-molecular-test-kit>
3. Betaflexiviridae. ICTV. URL: https://ictv.global/report_9th/RNApos/Betaflexiviridae
4. Blueberry scorch virus. *DPVweb.net*. URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/GCF_000861365.1/
5. Carlavirus. ViralZone. URL: <https://viralzone.expasy.org/268>
6. Chawla H., Kumar S., Sharma A., Rana V. Polymerase Chain Reaction: A Toolbox for Molecular Discovery // *ResearchGate*. — 2024. — DOI: [10.13140/RG.2.2.28476.08321](https://doi.org/10.13140/RG.2.2.28476.08321)
7. Chawla H., Sharma A., Rana V. Real-Time PCR (qPCR) for Plant Virus Detection and Expression Analysis // *ResearchGate*. — 2024. — DOI: [10.13140/RG.2.2.10078.78406](https://doi.org/10.13140/RG.2.2.10078.78406)
8. DAS-ELISA PROTOCOL (PAb and MAb). Agrifoodtest.nl. [Електронний ресурс]. URL: [https://www.agrifoodtest.nl/files/media/DAS-ELISA%20PROTOCOL%20\(PAb%20and%20MAb\).pdf](https://www.agrifoodtest.nl/files/media/DAS-ELISA%20PROTOCOL%20(PAb%20and%20MAb).pdf)
9. Immunology ELISA. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan—. [Електронний ресурс]. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555922/>

10. Immunology ELISA. *ResearchGate*. [Электронный ресурс]. URL: https://www.researchgate.net/publication/390583698_Immunology_ELISA
11. Integra Biosciences. How does PCR work? [Электронный ресурс] // Integra Biosciences Blog. — Режим доступа: <https://www.integra-biosciences.com/united-states/en/blog/article/how-does-pcr-work>
12. Koganezawa, H., Sano, T., & Yamashita, Y. (2008). Real-time PCR detection of Blueberry scorch virus in infected plants and its application to epidemiological studies. *Journal of Virological Methods*, 153(2), 177-183.
13. Lee J.W., Hwang M.S., Lim S., Cho I.S., Kim Y.J., Lee S.H., Lee S.H., Seo J.K. Complete genome sequencing and biological characterization of a novel *Carlavirus* infecting blueberries: Blueberry virus S // *Phytopathology*. — 2023. — Vol. 113, No. 2. — P. 233–242. — DOI: 10.1094/PHYTO-05-22-0186-R
14. M. Ciuffo, D. Pettiti, S. Gallo, V. Masenga, M. Turina. First report of Blueberry scorch virus in Europe. *British Society for Plant Pathology*. URL: <https://bsppjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-3059.2005.01198.x>
15. M.G. Bernardy, C.R. Dubeau, A. Braun, C.E. Harlton, A. Bunckle, D.T. Lowery, C.J. French & L.A. Wegener (2005) Molecular characterization and phylogenetic analysis of two distinct strains of Blueberry scorch virus from western Canada, *Canadian Journal of Plant Pathology*, 27:4, 581-591, DOI: 10.1080/07060660509507259
16. Martin R.R., Tzanetakis I.E. Scorch and shock: Emerging virus diseases of highbush blueberry and other *Vaccinium* species // *Plant Disease*. — 2009. — Vol. 93, No. 8. — P. 807–813. — DOI: 10.1094/PDIS-93-8-0807
17. NCBI <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
18. Sabaratnam S. Blueberry Scorch. British Columbia Ministry of Agriculture, Food and Fisheries, Abbotsford Agriculture Centre, Abbotsford, B.C.. C. 4. URL: <https://www2.gov.bc.ca/assets/gov/farming-natural-resources-and->

[industry/agriculture-and-seafood/animal-and-crops/plant-health/phu-blueberryscorchvirusss.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6111111/pdf/industry/agriculture-and-seafood/animal-and-crops/plant-health/phu-blueberryscorchvirusss.pdf)

19. Sun-Jung Kwon, Gug-Seoun Choi, Boram Choi, Jang-Kyun Seo. Molecular characterization of an unusual new plant RNA virus reveals an evolutionary link between two different virus families. *PLOS.one*. 2018.
20. Tripti Vashisth, Lisa Klima Johnson, Anish Malladi. An efficient RNA isolation procedure and identification of reference genes for normalization of gene expression in blueberry. *Springer-Verlag*. 2011.
21. Wegener L. A. EPIDEMIOLOGY AND STRAIN IDENTIFICATION OF BLUEBERRY SCORCH VIRUS ON HIGHBUSH BLUEBERRY IN BRITISH COLUMBIA / B.Sc., University of New Brunswick, 1999. 2006. 72 с.
22. Держстат України <https://www.ukrstat.gov.ua/>
23. Молекулярно-генетичні маркери в аналізі геномів рослин / М. Д. Мельничук та ін. ; Кабінет Міністрів України, Національний університет біоресурсів та природокористування України. Київ, 2012. 43 с.