

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І
ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ

Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології

УДК 602.641:633

ПОГОДЖЕНО

Декан факультету
захисту рослин, біотехнологій та екології

_____ Коломієць Ю.В.

«__» _____ 2023 р.

ДОПУСКАЄТЬСЯ ДО ЗАХИСТУ

В.о. завідувач кафедри
екобіотехнології та біорізноманіття

_____ Кваско О.Ю.

«__» _____ 2023 р.

МАГІСТЕРСЬКА РОБОТА

на тему «Дослідження антигенів рослинних вірусів методом поверхневого
плазмонного резонансу»

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код і назва)

Освітня програма Екологічна біотехнологія та біоенергетика

(назва)

Орієнтація освітньої програми освітньо-професійна

(освітньо-професійна або освітньо-наукова)

Керівник бакалаврської роботи

к.б.н., старший викладач

(науковий ступінь та вчене звання)

(підпис)

Таран О.П.

(ПІБ)

Виконав

(підпис)

Воронець Д.С.

(ПІБ студента)

КИЇВ-2024

**Національний університет біоресурсів
і природокористування України**

Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології

Кафедра екобіотехнології та біорізноманіття

Освітній ступінь «Магістр»

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

**ЗАТВЕРДЖУЮ
Завідувач кафедри**

“ _____ ” _____ 2024 р.

**З А В Д А Н Н Я
НА ВИПУСКНУ
МАГІСТЕРСЬКУ РОБОТУ СТУДЕНТУ**

Воронця Дмитра Сергійовича

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи «Дослідження антигенів рослинних вірусів методом поверхневого плазмонного резонансу»

керівник роботи Таран О. П к. б. наук, старший викладач

(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

2. Строк подання студентом роботи 10 листопада 2024 року

3. Вихідні дані до роботи: літературні джерела, рослини квасолі уражені вірусом звичайної мозаїки квасолі, ІФХ хворих і здорових рослин

4. Зміст розрахунково-пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити):

1. Розробити методики підготовки і обробки рослинних зразків для аналізу.
2. Провести серії експериментів для визначення чутливості SPR до вірусних часток BCMV.
3. Порівняти результати SPR з даними традиційного методу імуноферментного аналізу (ІФА) для перевірки точності та надійності.

4. Оцінити можливість масштабування методу для використання в практичних умовах і розробити рекомендації для його впровадження в діагностичні лабораторії.
5. Ідентифікувати можливі обмеження методу та розробити стратегії для їх подолання.

5. Консультанти розділів роботи

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
1	Таран О.П., старший викладач	20.09.23	20.09.24
2	Таран О.П., старший викладач	17.03.24	20.09.24
3	Таран О.П., старший викладач	15.06.24	05.11.24

6. Дата видачі завдання 01.09.23

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з/п	Назва етапів Магістерської кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1.	Визначення теми роботи	01.09.23	
2.	Визначення графіку роботи.	19.09-10.12.23	
3.	Бібліографічний пошук джерел інформації	20.09.23-01.10.24	

4.	Аналіз джерел	01.10.23-01.11.24	
5.	Відбір зразків квасолі для дослідження на наявність вірусу звичайної мозаїки (BSMV)	17.06.24	
6.	Підготовка вірусомісних зразків та налаштування SPR-обладнання для дослідження антигенів BSMV.	18-19.06.24	
7.	Дослідження антигенної активності BSMV методом SPR, зокрема, аналіз специфічності та чутливості до антигенів BSMV.	21.06-01.10.24	
8	Опрацювання результатів експерименту та їхня інтерпретація	01-15.10.24	
9	Розробка практичних рекомендацій щодо виявлення BSMV у зразках квасолі за допомогою SPR-методу та попередження вірусних інфекцій	16.10-05.11.24	
10	Оформлення та подання магістерської роботи	06.11.-10.11.24	

Студент

_____ (підпис)

Воронець Д.С.

(прізвище та ініціали)

Керівник роботи

_____ (підпис)

Таран О. П.

(прізвище та ініціали)

РЕФЕРАТ

Магістерська робота на тему «Дослідження антигенів рослинних вірусів методом поверхневого плазмонного резонансу» виконана на 89 сторінках друкованого тексту. Містить 14 рисунків та 1 таблицю, 4 додатки. Опрацьовано 132 літературних джерела.

Робота складається з розділів: зміст, вступ, літературний огляд, огляду об'єкту та методів дослідження, результати дослідження, висновків та списку використаної літератури.

Досліди проводились на кафедрі екобіотехнології та біорізноманіття НУБіП України.

Мета. Адаптація методу поверхневого плазмонного резонансу для діагностування вірусів рослин.

Предмет дослідження: діагностика вірусу звичайної мозаїки квасолі (BSMV) та вірусів, які інфікують бобові рослини за допомогою методу поверхневого плазмонного резонансу (SPR).

Об'єкт дослідження: вірус звичайної мозаїки квасолі (BSMV) в ліофілізованих зразках.

Методи дослідження: імуноферментний аналіз (ІФА), метод індукції флуоресценції хлорофілу (ІФХ), поверхневий плазмонний резонанс (SPR), методи статистичного аналізу, методи ліофілізації та інших процедур для підготовки зразків, методи візуалізації.

Для досягнення поставлені такі **завдання:**

1. Розробити методики підготовки і обробки рослинних зразків для аналізу.
2. Провести серії експериментів для визначення чутливості SPR до вірусних часток BSMV.
3. Порівняти результати SPR з даними традиційного методу імуноферментного аналізу (ІФА) для перевірки точності та надійності.

4. Оцінити можливість масштабування методу для використання в практичних умовах і розробити рекомендації для його впровадження в діагностичні лабораторії.
5. Ідентифікувати можливі обмеження методу та розробити стратегії для їх подолання.

Наукова новизна. Наукова новизна полягає в адаптації методу поверхневого плазмонного резонансу (SPR) для діагностики вірусів, що інфікують бобові рослини, зокрема вірусу звичайної мозаїки квасолі (BSMV), Вірус звичайного мозаїчного некрозу квасолі (BSMVN), Вірус мозаїки сої (SMV). Це дослідження пропонує нові підходи до аналізу антигенів таких вірусів, що забезпечує більш точні результати без використання мічених молекул. Застосування SPR дозволяє вивчати специфічні взаємодії між вірусними антигенами та антитілами на нанометровому рівні, що сприяє підвищенню чутливості та специфічності діагностики. Також запропоновані методи ліофілізації для підготовки зразків є оригінальним підходом у цій галузі.

Практична значимість. Практична значимість дослідження полягає у можливості впровадження отриманих результатів для розробки нових діагностичних інструментів у сільському господарстві. Використання SPR у діагностиці рослинних вірусів може значно прискорити виявлення вірусних інфекцій на ранніх етапах, що сприятиме зниженню економічних втрат через зниження врожайності. Крім того, метод може бути адаптований для діагностики інших рослинних патогенів, що розширює можливості його застосування в агробіотехнологіях та захисті рослин.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	9
ВСТУП.....	10
РОЗДІЛ 1. ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД	13
1.1. Рослинні віруси: класифікація та біологічні властивості.....	13
1.1.1. Історичний аспект класифікації	13
1.1.2. Огляд основних груп рослинних вірусів, їх структура та життєвий цикл. 14	
1.1.3. Сімейства та роди вірусів рослин, що інфікують бобові рослини ..	15
1.1.4. Поширеність та значення вірусних захворювань рослин.....	18
1.2. Структура та функції вірусних антигенів	20
1.2.1. Що таке вірус	20
1.2.2. Молекулярний склад вірусів	21
1.3. Методи ідентифікації та дослідження рослинних антигенів	24
1.3.1. ELISA	24
1.3.2. Метод імуноблотингу з використанням точкового блоту (DBIA) ..	24
1.3.3. Імуноферментний аналіз з тканинним блотингом (ТВІА)	25
1.3.4. Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР)	26
1.3.5. Методи мікроскопії	28
1.3.6. Інструменти біоінформатики.....	29
1.4. Метод Поверхневого плазмонного резонансу (СПР)	30
1.4.1. Принцип дії і специфіка методу.....	30
1.4.2. Переваги методи в порівнянні з традиційними та перспективи розвитку.....	35

1.4.3. Застосування СПР у дослідженні білків та антигенів	37
РОЗДІЛ 2 ОБ'ЄКТИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	39
2.1. Об'єкти дослідження.....	39
2.1.1. Структура геному ВСМV і ВСМNV.....	39
2.1.2. Структура геному ВСМV і ВСМNV.....	40
2.1.3. Структура геному ВСМV і ВСМNV.....	41
2.2. Методи ізоляції та очищення антигенів.....	44
2.2.1. Гомогенізація та екстракція.....	44
2.2.2. Ультрацентрифугування.....	45
2.2.3. Хроматографія	46
2.2.4. Центрифугування в градієнті щільності для розділення вірусних частинок.....	47
2.3. Методологія поверхневого плазмонного резонансу.....	49
2.3.1 Принцип SPR.....	49
2.3.2 Фази зв'язування – сенсограма.....	51
2.3.3 Методика виявлення ВСМV, ВСМNV та SMV.....	52
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ	53
3.1. Дослідження візуальних симптомів у рослин <i>Phaseolus vulgaris</i> , L сорту Пінто при інфікуванні <i>Bean common mosaic virus</i>	53
3.2. Порівняння методом ІФА збереженості <i>Bean common mosaic virus</i> у зневоднених зразках рослинного матеріалу за тривалого зберігання	57
ВИСНОВКИ ТА ПРОПОЗИЦІЇ	63
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	64
ДОДАТКИ.....	Помилка! Закладку не визначено.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

ІФА, ELISA – Імуноферментний аналіз

ПЛР – Полімеразна ланцюгова реакція

ВСМV – Вірус звичайної мозаїки квасолі

ВСМNV – Вірус звичайного мозаїчного некрозу квасолі

SMV – Вірус мозаїки сої

СПР – поверхневий плазмонний резонанс

SPR – surface plasmon resonance

ICTV – Міжнародний комітет з таксономії вірусів

ВСТУП

Актуальність. Дослідження вірусів рослин відкривають значні можливості з'ясування зв'язків між організмами в різноманітних ценозах, що важливо для розуміння і пошуку методів підтримування стабільності природних екосистем, а також штучно створених, таких, як агроценози. Віруси рослин наносять щорічно значні втрати урожаю сільськогосподарських культур. Наприклад, вважається, що наявність 1% інфікованих рослин у насадженнях картоплі призводить до зниження урожайності на 1%, а інфікованість насаджень може сягати десятків відсотків. [1]. Крім того, мінливий кліматичний сценарій і глобальне потепління може призвести до різкого зростання поширення і тяжкості таких захворювань по всьому світу, що зробить боротьбу з ними ще більш складним завданням.

Дослідження вірусних антигенів відіграє важливу роль у розумінні механізмів інфікування та розробці ефективних методів діагностики і контролю хвороб. Антигени є унікальними білковими структурами, які дозволяють організму виявляти збудників інфекцій, тому їх вивчення сприяє створенню дієвих інструментів для раннього виявлення вірусів. Це дозволяє своєчасно впроваджувати заходи для запобігання поширенню патогенів.

Метод поверхневого плазмонного резонансу (SPR) має суттєві переваги в діагностиці вірусів і вивченні їхніх антигенів. Він дозволяє проводити аналіз у режимі реального часу без використання мічених молекул, що робить експерименти більш економічними та швидкими. SPR забезпечує точне виявлення біомолекулярних взаємодій на нанометровому рівні, що дозволяє досліджувати вірусні антигени з високою чутливістю та специфічністю. Завдяки цьому методу можна значно покращити діагностику та розробити нові підходи до контролю вірусних інфекцій у рослин.

Мета. Адаптація методу поверхневого плазмонного резонансу для діагностування вірусів рослин.

Предмет дослідження: діагностика вірусу звичайної мозаїки квасолі (BSMV) за допомогою методу поверхневого плазмонного резонансу (SPR).

Об'єкт дослідження: вірус звичайної мозаїки квасолі (BSMV) в ліофілізованих зразках.

Методи дослідження: імуноферментний аналіз (ІФА), метод індукції флуоресценції хлорофілу (ІФХ), поверхневий плазмонний резонанс (SPR), методи статистичного аналізу, методи ліофілізації та інших процедур для підготовки зразків, методи візуалізації.

Для досягнення поставлені такі **завдання:**

1. Розробити методики підготовки і обробки рослинних зразків для аналізу.
2. Провести серії експериментів для визначення чутливості SPR до вірусних часток BSMV.
3. Порівняти результати SPR з даними традиційного методу імуноферментного аналізу (ІФА) для перевірки точності та надійності.
4. Оцінити можливість масштабування методу для використання в практичних умовах і розробити рекомендації для його впровадження в діагностичні лабораторії.
5. Ідентифікувати можливі обмеження методу та розробити стратегії для їх подолання.

Наукова новизна. Наукова новизна полягає в адаптації методу поверхневого плазмонного резонансу (SPR) для діагностики вірусів, що інфікують бобові рослини, зокрема вірусу звичайної мозаїки квасолі (BSMV). Це дослідження пропонує нові підходи до аналізу антигенів таких вірусів, що забезпечує більш точні результати без використання мічених молекул. Застосування SPR дозволяє вивчати специфічні взаємодії між вірусними антигенами та антитілами на нанометровому рівні, що сприяє підвищенню чутливості та специфічності діагностики. Також запропоновані методи ліофілізації для підготовки зразків є оригінальним підходом у цій галузі.

Практична значимість. Практична значимість дослідження полягає у можливості впровадження отриманих результатів для розробки нових діагностичних інструментів у сільському господарстві. Використання SPR у діагностиці рослинних вірусів може значно прискорити виявлення вірусних інфекцій на ранніх етапах, що сприятиме зниженню економічних втрат через зниження врожайності. Крім того, метод може бути адаптований для діагностики інших рослинних патогенів, що розширює можливості його застосування в агробіотехнологіях та захисті рослин.

РОЗДІЛ 1. ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД

1.1. Рослинні віруси: класифікація та біологічні властивості

1.1.1. Історичний аспект класифікації

У 1927 році Дж. Джонсон запропонував іменувати віруси, додаючи слово "вірус" і номер до загальної назви рослини, в якій вірус був вперше виявлений. Наприклад, TMV був названий "вірусом тютюну I". Джонсон і Хогган (1935) створили описовий ключ, що базувався на п'яти характеристиках: способах передачі, природних або диференційованих господарях, життєздатності *in vitro*, точці термічної загибелі та специфічних симптомах. Вони ідентифікували близько 50 вірусів і розподілили їх по групах. У 1937 році К. М. Сміт розробив схему, в якій відомі віруси або вірусні хвороби були розділені на 51 групу. Віруси були названі та згруповані за назвою рослини-господаря, в якій вони були вперше виявлені. Наприклад, TMV став *Nicotiana virus 1*, а в групі *Nicotiana virus* було 15 вірусів. Віруси з дуже різними властивостями могли потрапляти в одну групу. Хоча цей список був корисним для каталогізації вірусів, він не представляв собою повноцінну класифікацію[2].

У 1939 році Холмс представив класифікацію, засновану переважно на реакціях господарів і методах передачі вірусів. Він використовував латинську біномінальну-тринамінальну систему іменування, де TMV отримав назву *Marmor tabaci* (*marmor* означає мармур латинською). Його класифікація зосереджувалася на хворобах, а не на самих вірусах, і 53 з 89 розглянутих рослинних вірусів потрапили в рід *Marmor*, який об'єднував віруси з різними властивостями[2].

На Міжнародному конгресі з мікробіології в Москві в 1966 році була проведена перша зустріч Міжнародного комітету з номенклатури вірусів, на якій були присутні 43 представники мікробіологічних організацій з різних країн. Було створено організацію для розробки міжнародно визнаної таксономії та номенклатури для всіх вірусів, і встановлено правила для іменування вірусів.

Розвиток цієї організації, тепер відомої як Міжнародний комітет з таксономії вірусів (ICTV), був узагальнений [3;4]. ICTV опублікував сім звітів і проміжні доповіді в Archives of Virology [5].

Організми можна класифікувати двома основними способами: ієрархічною системою Лінеуса, яка розміщує таксони за важливістю різних властивостей, і методом Адансона, що класифікує на основі всіх доступних характеристик. Ієрархічна система, хоча зручна, не має надійної основи для вірусів через відсутність критеріїв важливості характеристик. Метод Адансона є трудомістким і потребує великої кількості незалежних характеристик для задовільного поділу. Наразі комп'ютери можуть допомогти в цій справі. На засіданні в Мехіко в 1970 році ICTV (тоді ICNV) затвердила перші таксони для вірусів, включаючи дві родини, типові роди і 22 роди для вірусів, що заражають хребетних, безхребетних або бактерій. Для рослинних вірусів було затверджено 16 груп. Водночас, рослинні вірусологи продовжували використовувати концепцію груп замість родин і видів[2].

Концепція виду у вірусології була прийнята ICTV у 1991 році[6]. Вид визначається як група вірусів, що утворює реплікативну лінію і займає певну екологічну нішу. Вид став основою сучасної класифікації вірусів, і ICTV розробила критерії для розмежування видів.

Наразі ICTV визначила таксономічні рівні Порядок, Родина і Рід. Можливе введення нових таксономічних рівнів, таких як Клас і Підряд.

1.1.2. Огляд основних груп рослинних вірусів, їх структура та життєвий цикл.

Відомі віруси були класифіковані на сім основних груп залежно від типу геному нуклеїнових кислот (Балтиморська класифікація) [**Помилка! Джерело посилання не знайдено.**]. Цими групами є: I: віруси dsDNA; II: віруси ssDNA; III: віруси dsRNA; IV: віруси ssRNA(+); V: віруси ssRNA(-); VI: віруси ssRNA(+), реплікація яких включає дію зворотної транскриптази (RT), що синтезує ДНК з матриці РНК; VII: віруси dsDNA, реплікація яких включає дію RT [8].

Сучасна класифікація рослинних вірусів поділяє їх на родини, роди та порядки. Родини вірусів, наприклад, мають спільні ознаки і поділяються на роди, які, у свою чергу, об'єднують вірусні види з подібними характеристиками. Визначення роду чітко не сформульоване, але зазвичай його розглядають як групу видів вірусів, що мають спільні риси та відрізняються від інших груп.

Наразі визнано 94 родів рослинних вірусів[8]. Іноді віруси, що явно належать до певної родини, не можуть бути віднесені до існуючих родів або створити нові через недостатність інформації. Такі віруси зазвичай позначаються як "невизначені".

Роди отримують назви або за типом виду (наприклад, *Caulimovirus* названий на честь вірусу, який викликає захворювання цвітної капусти), або за описовими ознаками, часто з використанням грецьких чи латинських слів (наприклад, *Geminivirus* від латинського "geminus", що означає "двійнята", щоб описати форму частинок вірусу).

Роди об'єднуються в родини за спільними характеристиками. Всього визнано 14 родин рослинних вірусів, деякі з них також включають віруси тварин. Існує також 22 роди, які ще не були віднесені до родин, і такі роди називаються "плаваючими". Подальші дані та зміни в класифікації можуть призвести до визначення нових родин вірусів. На рівні порядків в ICTV наразі визнано три. Наприклад, порядок *Mononegavirales* включає родини, до яких належить *Rhabdoviridae*, де є дві родини рослинних вірусів[3;4].

1.1.3. Сімейства та роди вірусів рослин, що інфікують бобові рослини

А. Сімейство *Caulimoviridae*

Це сімейство рослинних вірусів, які реплікуються через зворотну транскрипцію. Віруси цього сімейства мають циркулярні дволанцюгові ДНК-геноми з розривами або перервами на певних ділянках. Ці розриви слугують як точки для початку синтезу ДНК під час реплікації. Транскрипція є асиметричною, утворюючи РНК, довшу за геном, яка є і матрицею для зворотної транскрипції, і мРНК для деяких продуктів генів. Інші мРНК також можуть бути

транскрибовані. В сімействі виділяються два основних типи вірусів: каулімовіруси з ізометричними частинками і бадनावіруси з бациліформними частинками. Всього шість родів у цьому сімействі, кожен з яких має специфічні особливості організації геному.

- Рід 'Soybean chlorotic mottle virus-like' (типовий вид: вірус хлорозної мозаїки сої).

Віріони цього роду мають круглу дволанцюгову ДНК (circular double-stranded DNA) і використовують зворотне транскрибування для реплікації. Це рідко зустрічається у вірусів рослин, але властиве деяким вірусам з родини Caulimoviridae. Подібно до Caulimovirus, вірус Soybean chlorotic mottle virus-like має замкнутий дволанцюговий ДНК геном. Хоча цей рід схожий на рід Caulimovirus, відмінності полягають у організації геному. Реплікація відбувається через зворотне транскрибування, де геном вірусу спочатку транскрибується в довгу РНК, яка служить як шаблон для зворотного транскрибування та як матриця для синтезу вірусних білків. Для цього роду характерна передача через різних комах, подібно до роду Caulimovirus[5].

В. Сімейство Geminiviridae

Це сімейство включає віруси з циркулярними одноланцюговими ДНК (ssDNA) геномами, які містяться в дуплетних вірусних частинках, що складаються з двох неповних ікосаедрів.

- Рід Begomovirus (типовий вид: вірус золотистої мозаїки бобу).

Віруси роду Begomovirus мають круглі одиночні ланцюги ДНК (ssDNA), які зазвичай розділені на дві молекули ДНК. У деяких випадках геноми можуть бути монофрагментними, але більшість членів цього роду мають двокомпонентні геноми.

Віруси цього роду мають ізометричні частинки з $T = 1$ симетрією. Це означає, що частинки мають форму куба з icosahedral симетрією. Реплікація вірусів Begomovirus відбувається у клітинах рослинних господарів за допомогою ДНК-залежної РНК-полімерази. Вірусний геном складається з двох частин: один

компонент кодує всі необхідні білки для утворення вірусу, а інший компонент часто кодує додаткові білки, що сприяють реплікації та віроспонтанню[5].

Віруси цього роду передаються через білокрилих (whiteflies) у циркуляторному, пропагативному режимі. Це означає, що вірус проникає в організм переносника, реплікується всередині нього та передається іншій рослині через укуси. Віруси Begomovirus мають обмежену господарську специфічність і зазвичай інфікують тільки рослини з родини Dicotyledonous (двосім'ядольні). Це може включати різні види бобових, таких як соя та боби.

C. Родина Bromoviridae

Члени цієї родини мають ізометричні частинки з icosahedral симетрією $T = 3$, діаметром 26-35 нм, або бацилаформи частинки, симетрія яких базується на ікосаедрі. Їхній геном складається з лінійної позитивної однониткової РНК, розділеної на три молекули. Часто також капсидуються субгеномні РНК, що кодують білок капсиду; деякі представники родини також капсидують супутні або дефектні РНК.

- Рід Alfamovirus (типовий вид: Alfalfa mosaic virus)

Має бацилаформи частинки діаметром 18 нм і довжиною 30-57 нм, залежно від виду РНК, упаковані у білок масою 24 кДа. Ці віруси стабілізуються в основному завдяки взаємодії білка і РНК, тому вони чутливі до солей. Для реплікації вірусу необхідна наявність білка капсиду або субгеномної РНК, що його кодує. Через подібність послідовностей було запропоновано включити AMV до роду Parvovirus. AMV має широкий спектр господарів і передається попелицями в не постійний спосіб[5].

D. Сімейство Comoviridae

Віріони мають ізометричну форму з ікосаедральною симетрією $T = 1$ (псевдо $T = 3$). Капсиди складаються з одного або двох видів білків оболонки та інкапсулюють геном, який складається з двох молекул позитивного одноланцюгового РНК (ssRNA). РНК виражаються як поліпротеїни, які потім розщеплюються на функціональні білки.

- Рід *Comovirus* (типовий вид: вірус мозаїки квасолі)

Капсиди складаються з двох поліпептидних видів, що виражаються з меншої РНК. Комовіруси передаються жуками *Chrysomelid*. Вірус передається хризомелідами, що забезпечують його неперсистентну передачу. Уражені вірусом рослини, зокрема квасоля, демонструють симптоми мозаїки, включаючи жовті плями, деформації листків та зниження врожайності. Для контролю захворювання важливо управляти популяціями переносників, використовувати стійкі сорти та застосовувати санітарні заходи, такі як видалення уражених рослин і сівозміна. Діагностика може бути проведена за допомогою імунологічних тестів або молекулярних методів для виявлення вірусного РНК[5].

- Рід *Fabavirus* (типовий вид: вірус в'янення бобів I)

Як і комовіруси, капсиди фабавірусів складаються з двох білкових видів подібних за розміром, що виражаються з меншої РНК. Фабавіруси передаються попелицями в неперсистентний спосіб.

1.1.4. Поширеність та значення вірусних захворювань рослин

Віруси набирають економічного значення тільки тоді, коли вони суттєво порушують нормальний ріст рослин. Для експериментальних досліджень часто використовують прояви хвороби як індикатор біологічної активності вірусів. Раніше, до того як віруси були ізольовані та детально вивчені, симптоми хвороб відігравали важливу роль у вірусологічних дослідженнях. Однак, використання симптомів для ідентифікації і класифікації вірусів часто призводило до плутанини, оскільки не завжди враховувалося, що на прояви хвороби можуть впливати різні фактори.

Більшість поширених назв вірусів включають терміни, що описують важливі симптоми у основних хазяїв або рослин, з яких вперше було описано вірус. Існує велика кількість літератури, що описує хвороби, спричинені вірусами [9;10;11].

Деякі віруси при певних умовах можуть інфікувати рослину без явних ознак хвороби. Інші можуть призвести до швидкої загибелі рослини. Між цими

крайнощами може виникати широкий спектр захворювань. Інфекція вірусом не завжди викликає хворобу у всіх частинах зараженої рослини. Можна виділити шість ситуацій, коли явних ознак хвороби може не бути:

- інфекція дуже м'яким штамом вірусу;
- стійкий хазяїн;
- "відновлення" від симптомів хвороби у нових листках;
- листки, що уникають інфекції через їхній вік і положення на рослині;
- темно-зелені ділянки в мозаїчному малюнку;
- рослини, інфіковані криптичними вірусами.

Втрати від хвороб рослин мають не лише економічні наслідки, але й суттєво впливають на продовольчу безпеку (табл. 1.1). В той час як втрати, викликані грибками і бактеріями, добре задокументовані і часто представлені у вигляді списків, що відображають втрати від конкретних патогенів, вірусні захворювання часто об'єднуються в загальні категорії, такі як "вірусні хвороби" або "різні хвороби". В результаті, реальні економічні збитки від вірусів часто недооцінюються. Це відбувається через їх непомітність та довготривалий вплив, особливо на багаторічні культури і рослини, що розмножуються вегетативно.

Оцінити глобальні втрати від вірусних хвороб складно, оскільки більшість даних базуються на малих дослідженнях, а не на великих комплексних аналізах. Навіть ці дрібні дослідження не завжди дають точні дані для глобальних оцінок. Проблеми виникають через варіації у втраті від вірусів з року в рік, відмінності між регіонами і кліматичними зонами, різні методи оцінки, складнощі в ідентифікації вірусів, різні визначення терміна "втрати" і вплив інших факторів.

Більше того, втрата якості, яка може зробити продукт непотрібним на одному ринку, може бути цілком прийнятною в іншому. Попри всі ці обмеження, існують різні зібрання даних про втрати[12;13].

Таблиця 1.1

Втрати врожаю сільськогосподарських культур через віруси [14;15;16]

Культура	Вірус	Країни / Регіони	Втрати / Рік
Рис	Tungro	Південно-Східна Азія	$\$1.5 \times 10^9$
Рис	Ragged stunt	Південно-Східна Азія	$\$1.4 \times 10^8$
Цукровий тростина	Hoja blanca	Південь і Центральна Америка	$\$9.0 \times 10^6$
Ячмінь	Жовта карликова хвороба	Великобританія	$\pounds 6 \times 10^6$
Пшениця	Жовта карликова хвороба	Великобританія	$\pounds 5 \times 10^6$
Картопля	Вирощування картопляних листків	Великобританія	$\pounds 3-5 \times 10^7$
Картопля	Вірус Y картоплі	Світ	10–100%
Картопля	Вірус X картоплі	Світ	10–20%
Цукровий буряк	Жовта хвороба буряка	Великобританія	$\pounds 5-50 \times 10^6$
Цитрусові	Цитрусовий tristeza	Світ	$\pounds 9-24 \times 10^6$
Маниок	Африканська мозаїка маніоку	Африка	$\$1.9-2.7 \times 10^9$
Багато культур	Спотлива гниль помідорів	Всесвітньо	$\$1 \times 10^9$
Какао	Розширене гниття какао	Гана	1.9×10^8 дерев
Кукурудза	Вірус смугастого кукурудзи	Африка	$\$120-480 \times 10^6$

1.2. Структура та функції вірусних антигенів*1.2.1. Що таке вірус*

Віруси можна розглядати як динамічні нуклеопротеїнові комплекси зі здатністю поширюватися в клітинах і між організмами. Зібрані в клітину-хазяїна, інфекційні вірусні частинки або віріони є достатньо міцними, щоб захистити вірусний геном від зовнішніх загроз, і водночас вони готові змінити свою структуру та виконати механохімічні процеси, необхідні для інфікування додаткових клітин [17].

Віруси є живими організмами, здатними поширюватися всередині клітин і між різними типами організмів. Процес поширення та розмноження вірусу зазвичай має циклічний характер: інфекційна вірусна частинка (віріон) вводить свій генетичний матеріал у клітину-господаря, розмножується всередині неї, утворюючи нові віріони, які потім можуть інфікувати інші клітини. Цей процес часто називають «життєвим циклом вірусу».

Ось кілька причин для дослідження складу, поведінки, а також фізичних і (біо)хімічних властивостей вірусних частинок:

1. Вірусні частинки є чудовими моделями для дослідження та експериментів з молекулярним самозбиранням.
2. Вони допомагають зрозуміти зв'язки між структурою та функціями біологічних механізмів і біомолекулярних комплексів.
3. Глибоке розуміння динаміки, структури та властивостей вірусів є ключовим для розуміння їхніх життєвих циклів.
4. Вірусні частинки, їхні компоненти та механізми дії надають нові цілі для розробки противірусних препаратів.
5. Вивчення структурних факторів, що впливають на стабільність, динаміку та функції вірусів, може полегшити маніпулювання вірусними частинками, що є важливим для створення нових або поліпшених вакцин, векторів для генної терапії, доставки ліків за допомогою наночастинок, а також для інших біомедичних і нанотехнологічних застосувань.

1.2.2. Молекулярний склад вірусів

Нуклеопротеїнові комплекси, звані віріонами, складаються з численних копій одного або кількох білків плюс геном нуклеїнової кислоти. Їх розміри, форми, молекулярний склад, структурне розташування та складність відрізняються. Віруси без оболонки та з оболонкою є двома основними категоріями вірусів залежно від того, чи мають вони зовнішній ліпідний шар.

Вірусна ДНК міститься в капсиді, білковій оболонці, яка оточує віруси без оболонки. Капсид більш складних віріонів без оболонки може додатково

інкапсулювати інші білки або макромолекули, або всередині оболонки, або прикріплені до її зовнішньої сторони.

Білки вкриті ліпідним подвійним шаром або оболонкою, яка охоплює капсид вірусів з оболонкою. Деякі замкнуті віріони мають багат шарові структури, що складаються з білків, ліпідів і нуклеопротеїнів.

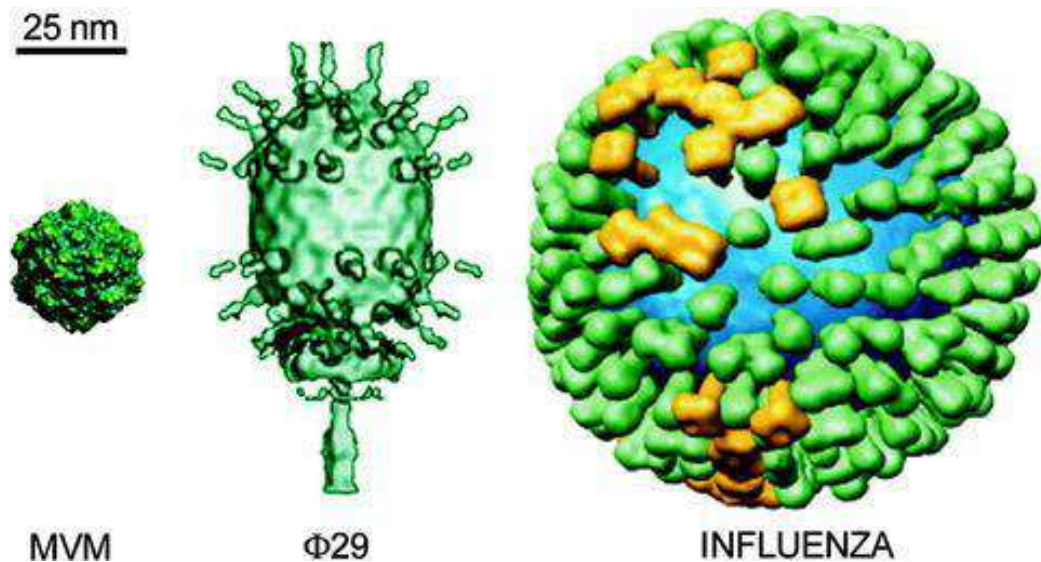


Рис.1.1. Основні типи вірусів за молекулярним складом. Ліворуч і по центру, віруси без оболонки; зліва, дуже простий вірус (парвовірус MVM); центру, складний вірус (хвостатий бактеріофаг φ29). Справа, вірус з оболонкою (ортоміксовірусний вірус грипу). Вони відтворені в (приблизно) однаковому масштабі, позначеному горизонтальною смугою (угорі ліворуч)[18-21].

Капсид вірусу

На структуру та функціональність вірусу істотно впливає капсид. Зазвичай його розуміють як симетричний білковий олігомер, що складається з кількох копій одного або кількох видів капсидних білків (CP), які є згорнутими поліпептидами. Більшість CPs розвивають четвертинні структури, причому спіральна та ікосаедрична симетрія капсиду є найбільш поширеними формами.

Хоча спіральні капсиди зустрічаються рідше, лише приблизно в 10% сімейств вірусів, вони є основними, потенційно необмеженими структурами, здатними охоплювати нуклеїнові кислоти різної довжини.

Ікосаедричні капсиди складаються з 60 ідентичних компонентів СР, що може обмежувати розмір геному[22]. Однак еволюція привела до рішень, які дозволяють ікосаедричним капсидам розміщувати великі геноми за допомогою багатьох субодиниць СР у квазіеквівалентних конформаціях. (рис. 1.3) Ця структура поширена, присутня приблизно у половині всіх сімейств вірусів.

У вірусах без оболонки капсид визначає архітектуру віріону, тоді як у вірусів з оболонкою загальна структура може бути більш мінливою та гнучкою.

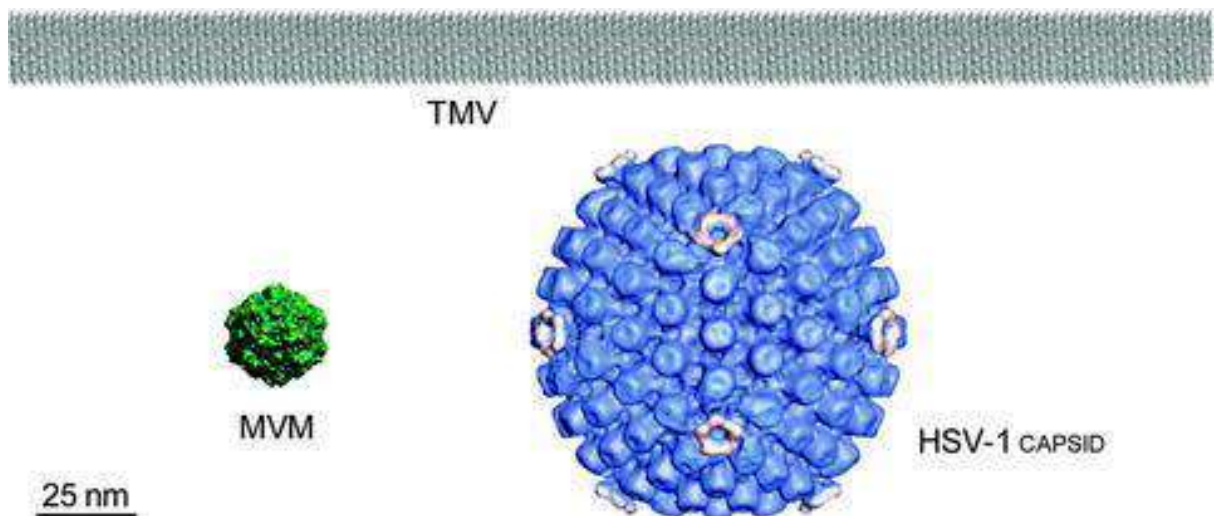


Рис 1.2. Основні типи вірусної капсидної симетрії. Верхнє зображення: спіральне; показаний капсид ВТМ. Нижні зображення: ікосаедричні; зображення зліва, простий ікосаедричний капсид парвовірусу MVM; праворуч, складний ікосаедричний капсид герпесвірусу HSV-1[23;24].

Типи вірусних нуклеїнових кислот

Методи реплікації та експресії геному під час активної фази вірусного циклу значною мірою залежать від типу геномної нуклеїнової кислоти, яку використовує вірус. Тип нуклеїнової кислоти, одноланцюговий (ss) або дволанцюговий (ds), має вирішальне значення для складання багатьох вірусних капсидів, механізму упаковки нуклеїнових кислот, організації нуклеїнових кислот у капсиді, дозрівання вірусні частинки, а також деякі властивості та функції віріону.

Віруси на основі РНК. ДНК використовується рибовірусами, іноді відомими як РНК-віруси. Вони використовують dsRNA (віруси dsRNA) і ssRNA (віруси ssRNA) у різних пропорціях. Крім того, віруси ssRNA(+) і віруси ssRNA(-) є двома різними типами вірусів ssRNA, які можна ідентифікувати за полярністю їх ланцюга генома РНК. Якщо послідовність геномної одноланцюгової нуклеїнової кислоти збігається з послідовністю вірусних інформаційних РНК (мРНК), вона вважається такою, що має позитивну (+) полярність; якщо ні, то вважається, що він має негативну (-) полярність. Деякі віруси, такі як ретровіруси, мають кілька копій геному, укладених у віріон, або їхній геном сегментований на кілька молекул нуклеїнових кислот, як у випадку вірусів грипу. РНК-віруси складають більшість відомих видів вірусів[25].

Віруси ДНК. Генетичний матеріал, який використовують дезоксивіруси або ДНК-віруси, — це ДНК. Вони використовують дцДНК (віруси дцДНК) або оцДНК (віруси оцДНК) у різних пропорціях.

1.3. Методи ідентифікації та дослідження рослинних антигенів

1.3.1. ELISA

Ефективним методом ідентифікації вірусів рослин є імуноферментний тест (ІФА), який забезпечує високу чутливість і кількісну оцінку. ELISA не залежить від співвідношення антитіла до антигену, оскільки він використовує мічені ферментами антитіла для ідентифікації реакцій без преципітатів, на відміну від інших серологічних методів, які залежать від імунних преципітатів. Це дає змогу ідентифікувати віруси в різних дозах і оцінити взаємодію між різними штамми. Зокрема, непрямий ELISA усуває потребу в унікальних ферментних кон'югатах для кожного антигену, спрощуючи виявлення вірусу та підвищуючи його ефективність для звичайних діагностичних застосувань [26-30].

1.3.2. Метод імуноблотингу з використанням точкового блоту (DBIA)

Одним із методів, який часто використовують для точної ідентифікації білків і нуклеїнових кислот, є імуноблоттинг (DBIA). Антиген спочатку виявляють на нітроцелюлозній мембрані, після чого первинне антитіло та

вторинне антитіло, сполучене з пероксидазою, інкубують. Процес, розроблений з використанням 4-хлор-1-нафтолу, вимагає лише 2-4 мкл матеріалу замість 250 мкл, що робить його корисним для ідентифікації менших кількостей вірусу, ніж ELISA [31].

DBIA є ефективним для широкомасштабного тестування, навіть якщо для цього може знадобитися порівняно великий об'єм вірусної антисироватки (50 мл 1 мг/мл). Проте збережений розчин антитіл до вірусу можна використовувати протягом шести місяців без значної втрати чутливості. Було продемонстровано, що DBIA більш чутливий, ніж ELISA та імуносорбентна електронна мікроскопія при виявленні 0,35 нг очищеного вірусу мозаїки вігні (CrMV)[32].

Крім того, метод використовувався в імунологічному аналізі тканинного блоту (TBIA), який використовує нітроцелюлозні мембрани з обох сторін для виявлення вірусів, таких як вірус жовтої мозаїки квасолі. Успішна заміна нітроцелюлозних мембран на звичайний папір є результатом заходів щодо скорочення витрат. Використовуючи неглянцевий папір для плоттера HP, такі віруси, як вірус мозаїки люцерни та вірус плямистості квасолі, були успішно ідентифіковані в тканинах рослин. Однак його здатність ідентифікувати віруси, обмежені флоемою, такі як вірус жовтого карликового ячменю (BYDV) і вірус скручування листа квасолі (BLRV), була не ідеальною[33].

1.3.3. Імуноферментний аналіз з тканинним блотингом (TBIA)

Для виявлення рослинних вірусів в інфікованих рослинах широко використовується метод блоттингу тканини з використанням нітроцелюлозних мембран. Процес створення тканинних плям передбачає обережне, але міцне притискання поверхні свіжозрізаної тканини до нітроцелюлозних мембран. За даними Хсу та Лоусона, вірус плямистого в'янення (TSWV) присутній у тканинних плямах із заражених листя та стебел. Згодом антиген вірусу виявляють за допомогою мічених ферментом імунологічних зондів. Здорові тканини не стали фіолетовими на відміну від хворих, навіть коли хлорофіл контрольних рослин демонстрував зелену реакцію[34].

Тканини з рослин, заражених вірусом некротичної жовтої квасолі (FBNYV), показали антиген-специфічні реакції з червоним фарбуванням, обмеженим судинними тканинами[35]. Шервуд вивчив кілька методів ідентифікації вірусу смугастої мозаїки пшениці (WSMV), таких як вестерн-блот, сендвіч-ELISA з подвійними антитілами та імунозв'язуючий аналіз на фільтрувальному папері. Коли було потрібно менше експериментів, підхід із використанням фільтрувального паперу був швидшим і економічнішим і міг виявити лише 100 пг чистого вірусу[36].

Техніка ТВІА виявилася достатньо чутливою для ідентифікації вірусів у всіх компонентах рослини на різних фазах росту, включаючи віруси, які вражають рослину системно, такі як AMV, CMV, BBMV та інші, а також віруси, обмежені флоемою, такі як BLRV і FBNYV. Як моноклональна, так і поліклональна антисироватки працювали добре. Завдяки перевагам над класичним ELISA щодо швидкості та вартості ця технологія виявилася особливо корисною для тестування груп розсади та дозволила виявити віруси, які передаються через насіння. Без шкоди для чутливості лікування можна завершити менш ніж за чотири години з найменшою кількістю необхідного обладнання, що робить його швидким і доступним[37].

1.3.4. Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР)

Завдяки синтезу ДНК *in vitro* полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) є потужною технікою для експоненційної ампліфікації окремих послідовностей ДНК. У процесі беруть участь три основні етапи:

- (a) денатурація цільової ДНК;
- (b) відпал двох олігонуклеотидних праймерів до розділених ниток;
- (c) використання термостабільної ДНК-полімерази для розширення праймерів[38].

До 50 повторів цих процедур дозволяють щойно виготовленим ланцюгам ДНК функціонувати як матриці для додаткової ампліфікації. Специфіці

процедурі надають синтетичні праймери, які зв'язуються з кінцями цільової послідовності та ідентифікують їх. ДНК-полімераза *Thermus aquaticus* (Taq), яка була представлена в 1988 році та забезпечувала фермент, стабільний при високих температурах, усувала потребу в заміні ферменту після кожного циклу та зменшувала загальні витрати, повністю змінила техніку ПЛР [39].

ПЛР має кілька переваг перед звичайними методами діагностики, включаючи високу чутливість (може виявити одну цільову молекулу), універсальність, швидкість і здатність виявляти патогени без попередньої культури. Подібно до серології, ПЛР можна використовувати для виявлення одного збудника або сукупності споріднених інфекцій, оскільки, залежно від використовуваних праймерів, вона може бути розроблена як для вузької, так і для широкої селективності. Порівняно з серологічними підходами, синтез реагентів ПЛР з вузькою або широкою специфічністю є більш універсальним і економічним, оскільки вартість синтезу сотень праймерів ПЛР може бути еквівалентна вартості створення невеликої кількості моноклональних антитіл [40].

Незважаючи на те, що ПЛР широко використовується в багатьох галузях, діагностика захворювань рослин за допомогою неї є основним акцентом у застосуванні цього огляду в патології рослин. Основна суміш ПЛР є відносно простою і складається із зразка, води, буфера, солей, dNTP, праймерів і ДНК-полімерази. Однак фізична хімія та кінетика процесу є складними та погано вивченими. Замість того, щоб вивчати сам процес ПЛР, дослідження в основному зосереджені на створенні нових способів використання технології. На специфічність та ефективність ампліфікації ДНК у ПЛР впливає низка параметрів, і для оптимізації реакційної суміші та температурних циклів часто потрібні емпіричні модифікації. Незважаючи на таку складність, різноманітні хвороби рослин були успішно виявлені за допомогою ПЛР у різноманітних господарях та матеріалах навколишнього середовища [41].

1.3.5. Методи мікроскопії

Імуноелектронна мікроскопія базується на принципах трансмісійної електронної мікроскопії (ТЕМ). Метод трансмісійної електронної мікроскопії (ТЕМ) створює зображення, пропускаючи промінь електронів високої напруги через зразок і спостерігаючи, як електрони взаємодіють з матеріалом. Ефективна довжина хвилі електронного променя в 10⁵ разів коротша, ніж у видимого світла, що дозволяє електронним мікроскопам досягати значно кращої роздільної здатності, ніж світлові мікроскопи. Насправді оптика, необхідна для фокусування променя, і стабільність зразка обмежують роздільну здатність ТЕМ-мікроскопа, а не довжину хвилі електрона. Щоб електронний промінь міг подолати всю довжину колонки ТЕМ у високому вакуумі, рідкий зразок необхідно нанести на сітку для криометодів, а потім швидко заморозити у склоподібному льоду або висушити за допомогою розсіюючої електроні плями, щоб створити контраст для зображення [**Помилка! Джерело посилання не знайдено.**].

Негативне фарбування дозволяє уникнути багатьох недоліків криометодів, таких як витрати часу та коштів, і забезпечує швидкий і простий спосіб визначення структурної інформації про зважені частки. Методи негативного фарбування використовуються в імуноелектронній мікроскопії, яка також дозволяє виявити антиген і проаналізувати структурну організацію зразка. Це особливо корисно для зразків, у яких незрозуміло наявність певного антигену, або коли ідентифікація та локалізація ускладнені численними конформаціями. Ультратонкі зрізи тканин, оброблені для мікроскопії, часто використовуються як зразки для імуноелектронної мікроскопії; однак маркування імунним золотом рідких зразків, що містять вірусні суспензії, також може дати важливу інформацію. Ці методи корисні не лише для вивчення живих вірусів, але й для визначення вірусних компонентів у вакцинах, частинок, які нагадують віруси, білків, виділених із вірусів, та інших зразків, що мають відношення до сучасних вірусологічних застосувань [43;44].

1.3.6. Інструменти біоінформатики

Технологічний прогрес за останні кілька десятиліть повністю змінив спосіб ведення науки. Приклади цих досягнень включають створення комп'ютерів та Інтернету, а також інструментів вимірювання високої пропускної здатності, таких як мас-спектрометрія, візуалізація та секвенування ДНК. Ці досягнення призвели до створення нових галузей, включаючи оміку, біоінформатику та машинне навчання. Не в останню чергу в вірусології ці розробки розширили горизонти в усіх наукових областях. Одним із найбільших ефектів є свіжий погляд на віросферу, яка є дуже різноманітною [45].

Біоінформаційний аналіз omics та інших наборів біологічних даних залежить від конкретних комп'ютерних інструментів. Ці інструменти розроблені, починаючи з простого аналізу та просуваючись до більш складних програм. Програмне забезпечення для перевірки даних із пристроїв секвенування наступного покоління, створення послідовностей генів або білків і проведення статистичних тестів – це кілька прикладів базового використання. Конвеєри для метагеномного аналізу, анотації генома або асоціації генотип-фенотип є прикладами аналізу вищого рівня. У сукупності біоінформатика є, мабуть, однією з найбільш широко застосовуваних субдисциплін наук про життя. Аналіз наборів даних omics є найбільшим споживачем комп'ютерного часу у вірусології, якщо виміряти час обчислювального аналізу [45].

Завдяки біоінформаційним методам можна сконструювати ПЛР-панелі, які захоплюють більш різноманітний діапазон вірусів, але ці аналізи завжди обмежуються ідентифікацією вірусів, які належать до відомого діапазону, і не можуть використовуватися для пошуку абсолютно нових вірусів. Щоб вирішити цю проблему, можна використовувати нецільове секвенування ізольованих вірусів або метагеноміку — дослідження цілого зразка ДНК. Шляхом зіставлення показань, отриманих із зразка, з еталонною послідовністю відомого вірусу, який спочатку використовувався для створення праймерів, можна знайти варіанти відомих вірусів. Нові ПЛР-праймери можуть бути створені для

захоплення цих варіантів, якщо достатня кількість високоякісних зчитувань охоплює ділянки, де послідовності праймерів повинні з'єднатися з мішенню. Це можна зробити за допомогою спеціалізованих методів ідентифікації, які можуть викликати варіацію з високою достовірністю[45].

1.4. Метод Поверхневого плазмонного резонансу (СПР)

1.4.1. Принцип дії і специфіка методу

Новаторська робота Отто, Кречмана та Ретера наприкінці 1960-х років встановила явище поверхневого плазмонного резонансу[46;47;48]. У 1990-х роках компанія Pharmacia (пізніше перейменована на Biacore і в даний час продається компанією Cytiva, раніше GE Healthcare) спочатку випустила його на ринок як біосенсор, який міг ідентифікувати взаємодію між іммобілізованими видами та їх солубілізованим зв'язуючим партнером. За останні три десятиліття відбулося значне покращення в точності та чутливості біосенсорів на основі SPR завдяки прогресу в системах обробки та контролю рідин [49-52]. Крім того, надійні методи та проекти аналізу даних [53;54;55] сприяли визнанню поверхневого плазмонного резонансу (ППР) як провідного інструменту в галузі аналіз взаємодії біомолекул.

Його основна перевага полягає в тому, що він може ідентифікувати взаємодії без мітки, що спрощує спосіб аналізу. Замість того, щоб виявляти всі сполуки з певною міткою, цей підхід знаходить лише біоактивні хімічні речовини, оскільки взаємодія залежить від біологічної події між іммобілізованими та солубілізованими видами. Відстеження зустрічі в реальному часі є ще однією важливою перевагою SPR. Це дає змогу аналізувати взаємодію кінетично на додаток до вимірювання спорідненості. [56]

З міркувань кількісного визначення SPR пропонує інтригуючу заміну імуноферментним аналізам (ELISA) [**Помилка! Джерело посилання не знайдено.**], оскільки аналіз концентрації також можливий. Скринінг на наркотики; оцінка ефективності препарату; кількісне визначення вакцини; безпечність харчових продуктів (виявлення домішок і бактерій); біотерапевтична

характеристика та контроль якості; біотерапевтична безпека; медична діагностика; екологічний моніторинг; і моніторинг біопродукції – це лише деякі сфери, де застосовувалася технологія SPR. Зростаюча кількість досліджень, які демонструють точні вимірювання концентрації в складних середовищах, таких як клітинний лізат і людська сироватка, прокладають шлях для використання біосенсорів на основі поверхневого плазмонного резонансу в системі моніторингу біопроцесів, незважаючи на відсутність досліджень на тему використання біосенсора SPR онлайн або на лінії з біореактора автоматизованим способом [58;59].

Спочатку буде обговорено явище SPR разом із ключовими факторами для надійного аналізу SPR та широкими рекомендаціями щодо кінетичних і концентраційних досліджень із використанням SPR.

Біосенсори поверхневого плазмонного резонансу працюють, спочатку проєктуючи поляризоване монохроматичне світло на благородний метал, зазвичай золото, а потім стимулюючи електронну хмару, або плазмон, на межі між металом і діелектричним середовищем. В результаті цього поширюється непостійна хвиля. Поверхневі плазмонні коливання посилюються, і виникає резонанс, коли ближнє інфрачервоне світло від лазера потрапляє на металеву поверхню таким чином, що компонент падаючої хвилі, паралельний поверхні (k_x), ідеально вирівнюється з поверхневими плазмонними хвилями (k_{sp}). Щоб гарантувати, що все світло відбивається всередині, зазвичай використовується скляна призма (див. Малюнок). Це відповідає геометрії, запропонованій Raether і Kretschmann [60;61].

У результаті, коли виникає резонанс, енергія, яка була б використана для відбиття світла, замість цього використовується для посилення коливань електронів. Це призводить до зменшення інтенсивності відбитого світла в реальному часі. Кут SPR, або кут падіння світла, при якому виникає резонанс, визначається показником заломлення діелектричного середовища в зоні

розповсюдження миттєвих хвиль [Помилка! Джерело посилання не знайдено.].

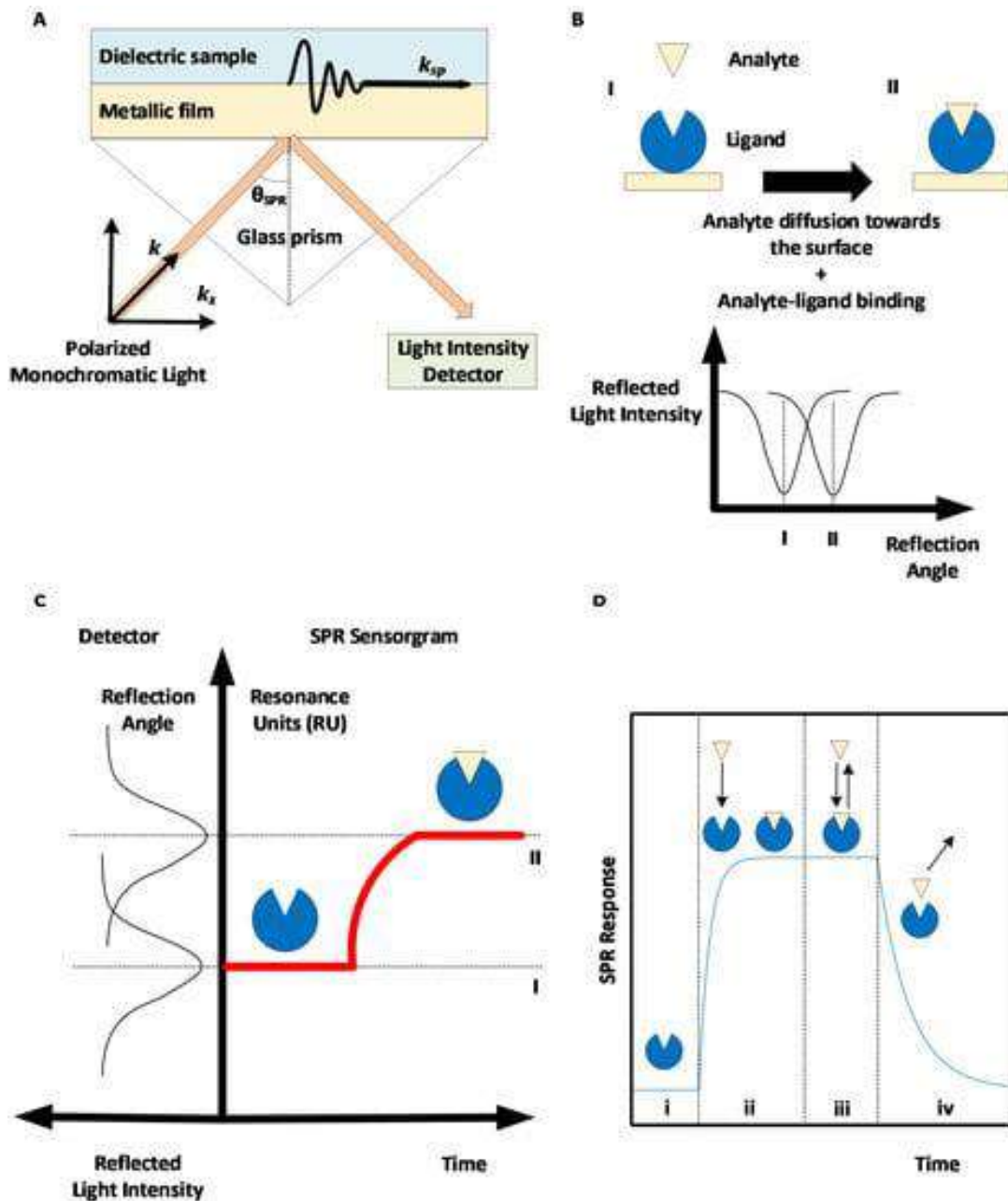


Рис.1.3. Принцип біосенсора на основі поверхневого плазмонного резонансу (SPR). (А) Конфігурація біосенсора Кречмана-Ретера. Проектування ближнього інфрачервоного світла під певним кутом (кут SPR) призводить до накопичених коливань електронних хмар (плазмонів) на межі розділу між зразком діелектрика та металевією поверхнею, отже, до резонансу поверхневого плазмону. (В) Накопичення матеріалів (молекул аналіту) на металевій поверхні SPR створює зміну кута SPR. (С) Зміну кута SPR можна відстежувати в режимі

реального часу, щоб отримати сенсорограму SPR. (D) Фази сенсограмми SPR: (i) базова лінія, (ii) фаза асоціації, (iii) рівновага та (iv) фаза дисоціації [**Помилка! Джерело посилання не знайдено.**].

Деякі біосенсори SPR використовують спектрофотометр як детектор і змінюють довжину хвилі падаючого світла. Також можливо спостерігати зміну інтенсивності, зберігаючи постійні кут і довжину хвилі. Цей метод спрощує використання пристроїв SPR візуалізації (SPRi; див. Розділ 7) для вимірювання в багатьох місцях виявлення одночасно. Тим не менш, оскільки зсув інтенсивності є лише похідним вимірюванням кута SPR/довжини хвилі, які більш тісно пов'язані з кількістю зібраного матеріалу поблизу поверхні, перевагу надають конструкціям, які безпосередньо вимірюють кут SPR або довжину хвилі [**Помилка! Джерело посилання не знайдено.**]. Також можна відстежувати зміни світлової фази під час SPR. Через складну апаратуру, яка необхідна, ці установки не були широко комерціалізовані, хоча вони дозволяють покращити чутливість, оскільки зсув фази світла відбувається більш різко, ніж зміни його інтенсивності.

За допомогою біосенсорів SPR можливі вимірювання взаємодії аналіту, введеного близько до поверхні, наприклад через мікрофлюїдний канал, і ліганду, іммобілізованого на металевій поверхні біосенсора, у реальному часі без міток. Аналіти накопичуються поблизу біосенсора в результаті біологічної взаємодії між лігандом і аналітом. Цю зміну в показнику заломлення та куті SPR можна спостерігати, щоб створити сенсорограму SPR.

Використовуючи комерційно доступні сенсорні чіпи SPR із прив'язаним шаром карбоксиметильованого декстрану, такі як ті, які надає Cytiva, іммобілізацію ліганду можна здійснити різними способами хімічно. Коли це можливо, перевагу надають орієнтованим методам, оскільки вони зменшують стеричні перешкоди та варіабельність взаємодії лігандів, полегшуючи інтерпретацію сенсограмм.

Одну і ту саму поверхню сенсора можна використовувати для кількох циклів SPR після іммобілізації ліганду. Цикл SPR, або сенсограму, можна розділити на три основні фази: фазу введення буфера (яка використовується для отримання базового сигналу), фазу введення аналіту (утворює комплекси аналіт-ліганд) і друга фаза введення буфера (яка дисоціює комплекси аналіт-ліганд). Для більшості високоякісних біосенсорів SPR користувач може регулювати температуру, швидкість потоку ін'єкції та тривалість асоціації та дисоціації. Резонансні одиниці, або RU, використовуються для кількісного визначення сигналу SPR. Один RU приблизно дорівнює одному пг/мм² іммобілізованого білка [Помилка! Джерело посилання не знайдено.].

Наявність фізіологічно активних молекул лігандів має бути узгодженою на сенсограмах, щоб виробляти повторювані сигнали. Щоб гарантувати це, усі молекули аналіту повинні бути видалені з поверхні до кінця фази дисоціації. Для систем, які повільно дисоціюють, може знадобитися етап регенерації, на якому подається більш жорсткий розчин (зазвичай з точки зору рН або концентрації солі). Вибір правильного розчину для регенерації може бути складним, оскільки метою регенерації є усунення всіх молекул аналіту без руйнування або усунення будь-яких молекул лігандів [66;67].

Неспецифічна взаємодія між поверхнею SPR та аналітом або іншими компонентами введеного зразка може спричинити зсув на сенсограмах SPR. Крім того, можна побачити артефакти сигналу, які можуть бути спричинені різкими змінами показника заломлення під час переміщення між буферами, електричними збуреннями від рухомих частин біосенсора тощо. Через це надійний експериментальний протокол передбачає використання друга поверхня SPR (макет) для довідки. Послідовність ін'єкції, що застосовується до макетної поверхні, така ж, як і для активної поверхні, за винятком того, що молекули ліганду відсутні. Таким чином, неспецифічні внески усуваються шляхом віднімання сигналу, записаного на активній поверхні, від сигналу, записаного на еталонній поверхні. Повторення тієї самої процедури введення з порожньою

пробою (тобто введення буфера замість аналіту) або аналіту з нульовою концентрацією можна використовувати як другий еталон. Це усуває дрейфи сигналу, оскільки показник заломлення також залежить від температури, і дрейфи сигналу можуть виникнути, коли температура поблизу поверхні SPR змінюється під час експерименту. Сенсорограми з подвійним прив'язуванням – це ті, які отримують шляхом вирахування як еталонного холостого сигналу ін'єкції, так і еталонного сигналу поверхні [**Помилка! Джерело посилання не знайдено.**].

Два основних застосування поверхневого плазмонного резонансу (SPR): вимірювання розчину аналіту та дослідження кінетичної та рівноважної поведінки взаємодії аналіт-ліганд. Хоча останнє може здатися більш придатним для моніторингу біопроцесів, все ж важливо стежити за критичними характеристиками якості продукту (CQA), оскільки вони можуть впливати на те, як швидко продукт зв'язується зі своїми біологічними партнерами.

1.4.2. Переваги методи в порівнянні з традиційними та перспективи розвитку

Поверхневий плазмонний резонанс (SPR) можна використовувати для вивчення взаємодії між білками (наприклад, взаємодія рецептор-ліганд), малими молекулами та білками або клітинами та білками. SPR є надзвичайно привабливим методом з кількох причин. На відміну від Co-IP, SPR не вимагає ідентифікації білка, який вас цікавить. Це позбавить вас від використання радіоактивності та додаткової роботи, пов'язаної з розробкою флуоресцентних міток. Однак справжня краса поверхневого плазмонного резонансу полягає в його здатності забезпечувати кількісні вимірювання кінетики, спорідненості та термодинаміки взаємодії в реальному часі. SPR є фундаментальною ідеєю багатьох застосувань кольорових біосенсорних чіпів і став галузевим стандартом для визначення кінетики та спорідненості. Термодинамічному процесу сприяє біосенсор SPR, який вимірює контакт при різних температурах [69].

Традиційні аналітичні методи включають імунологічні аналізи, хроматографічні методи, глікозильні мікрочіпи та проточну цитометрію з метою скринінгу та вимірювання взаємодій, специфічних для вуглеводів. Ці методи дуже чутливі та корисні для характеристики взаємодії між вуглеводами та білками; однак вони часто виснажливі та забирають багато часу, вимагають мічення зонда перед виявленням і дають мало інформації щодо афінності зв'язування. Наприклад, імуноферментний аналіз (ELISA) можна використовувати для широкого скринінгу зразків, щоб розрізнити хороші та погані зв'язувальні речовини, і не потребує величезної кількості реагентів і зразків; однак інформація про кінетику зв'язування недостатньо задокументована [70].

Метод SPR дозволяє проводити аналіз біомолекулярних процесів у режимі реального часу та забезпечує точні кінетичні параметри, такі як k_a та k_d , а також відносне ранжування, наприклад mAbs, без необхідності мічення зонда. Прилади SPR можна використовувати для високопродуктивного скринінгу так само, як і ELISA, і вони також дозволяють легко розробити аналіз і вимагають невеликої кількості зразка. Оскільки SPR є неруйнівним методом, його можна поєднати з додатковим методом, щоб дослідити той самий зразок більш детально та отримати більше інформації про склад аналіту [71].

Останні розробки в аналізі даних SPR зосереджені на аналізі складних систем, де на поверхні датчика відбувається кілька взаємодій. Наприклад, введення розчинів, що містять комбінацію аналітів, які мають спільний ліганд, було запропоновано як засіб підвищення пропускної здатності біосенсора SPR у контексті скринінгу ліків. Щоб досягти цього, були запропоновані аналітичні методи, які дозволяють витягти кінетичні характеристики двох аналітів із сенсограм, отриманих шляхом ін'єкції однієї комбінації цих аналітів, і модельна система була використана для демонстрації концепції [72]. Крім збільшення пропускної здатності, для якої охоче змішуються різні аналіти, можна також прагнути визначити індивідуальні кінетичні параметри різних (біо)молекул, які

важко відокремити одна від одної. Наприклад, різні глікоформи терапевтичних моноклональних антитіл, вироблених у культурах клітин ссавців, можуть бути нелегко розділені. Однак добре відомо, що на зв'язування з їхніми рецепторами впливає стан їх глікозилування. Отже, вивчення цієї взаємодії за допомогою SPR призводить до складних сенсограмм, які неможливо належним чином проаналізувати за допомогою простої моделі Ленгмюра [73;74;75]

З метою аналізу аналітів, які складно розділяти, а не збільшення пропускної здатності, структуру аналізу кількох аналітів було розширено, щоб охопити випадки з N аналітами. Методика реалізована в модельній системі, яка містить карбоангідразу II та її інгібітори. Він може знайти застосування в аналізі глікозилуваних або диференційовано згорнутих білків. Хоча це вимагає попереднього знання кінетичних параметрів для кожного аналіту, було запропоновано підхід до оцінки складу.

Завдяки прогресу в моделюванні тепер можна аналізувати складні сенсограми, отримані в результаті неоднорідності аналіту або ліганду[76].

1.4.3. Застосування СПР у дослідженні білків та антигенів

При дослідженні вірусоспецифічних макромолекул часто використовується метод поверхневого плазмонного резонансу (SPR), з акцентом на окремих частинах, а не на повних вірусних частинках[77]. Рекombінантні білки та вірусні пептиди можна використовувати як моделі для вивчення спорідненості антитіл, навіть якщо їх структура та конформація змінюються, коли вони інтегруються у вірусні частинки. Оскільки кожен вірус має різноманітні антигени, які ідентифікуються за їхніми унікальними білками та просторовими структурами, надзвичайно важливо досліджувати взаємодії між антитілами та вірусами в умовах, подібних до тих, що зустрічаються *in vivo*.

Малі віруси, такі як вірус тютюнової мозаїки (TMV), мають менше антигенних детермінант і тому підходять для розробки технологій виявлення. TMV є хорошою моделлю для вдосконалення методів виявлення, оскільки він компактний і має лише один білок оболонки. Тим не менш, SPR має обмеження

у вірусології, особливо при виявленні інтактних вірусів розміром понад 100 нм, оскільки роздільна здатність приладу залежить від глибини проникнення довжини хвилі, яка становить приблизно 700 нм. Це обмежує здатність SPR забезпечувати більшим вірусам лінійну залежність між зміщенням кута та загальною масою.

Незважаючи на ці недоліки, SPR ефективно використовується у вірусології для різноманітних цілей. Він був застосований для дослідження взаємодій імуноглобуліну та вірусу [78], аналізу оборотних взаємодій вірусів із спеціально модифікованими поверхнями [81] та ідентифікації специфічних антитіл за допомогою іммобілізованих інтактних вірусів [82]. Крім того, оскільки віруси рослин, як правило, невеликі за розміром, SPR особливо добре підходить для їх вивчення. Проте методи на основі SPR ще не використовувалися для кількісного виявлення інтактних вірусів.

Одним з прикладів дослідження, де вивчалось використання SPR для швидкої діагностики вірусів непошкоджених рослин, особливо зосереджуючись на вірусі тютюнової мозаїки (TMV) Техніка поверхневого плазмонного резонансу (СПР) демонструє чутливість на рівні 250 с.а./μг. При інструментальній похибці близько 3–5 с.а., співвідношення сигнал/шум досягає 70. Динамічний діапазон концентрацій вірусу при розведенні сироватки 1:10 становить близько 2–20 μг/мл. Межа виявлення залежить від умов, коли $[TMV] = [IgG]$. Абсолютна межа виявлення для комірки діаметром 1.5 мм визначається кількістю вірусних часток (близько 5×10^9 часток). Для чутливої поверхні діаметром 1.5 μм ця межа становить 10^3 – 10^4 вірусних часток. Методика надійна для виявлення вірусів, оскільки при $[TMV] \geq [Ab]$ реакція на вірус буде вдвічі вищою за негативний контроль, а при нижчих концентраціях кут зміщення пропорційний концентрації вірусу. Метод легко застосовувати на комерційно доступних приладах, що розширює можливості досліджень з вірусологічними зразками [81].

РОЗДІЛ 2 ОБ'ЄКТИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Об'єкти дослідження

Дослідження виконували у лабораторії кафедри екобіотехнології та біорізноманіття НУБіП України.

Об'єктом мого дослідження були віруси що інфікують бобові рослини, зокрема Вірус звичайної мозаїки квасолі (BSMV) в ліофілізованих зразках, Вірус звичайного мозаїчного некрозу квасолі (BSMVN), Вірус мозаїки сої (SMV) та інші.

2.1.1. Структура геному BSMV і BSMVN

Геном позитивної одноланцюгової РНК (+ssRNA) із приблизно 9600 нуклеотидів (nt) спільний для BSMV та BSMVN. Цей геном міститься в гнучких ниткоподібних віріонах без оболонки, які мають довжину 750 нм і діаметр 11–13 нм [82;83;84]. Вірусний геном-зчеплений білок (VPg) ковалентно приєднаний до 5'-кінця геному, тоді як 3'-кінець геному поліаденілований [112]. Геноми BSMV і BSMVN, як і інших потівірусів, кодуєть велику відкриту рамку зчитування (ORF), яка транслюється в поліпептид 350 кДа. [85]. Три вірусні протеїнази гідролізують цей поліпептид, утворюючи десять зрілих білків: протеїн 1 (P1), допоміжний компонент-протеаза (HC-Pro), протеїн 3 (P3), 6-кілодальтон-протеїн 1 (6K1), 5-кілодальтон-протеїн 2 (6K2).), циліндричне включення (CI), зчеплене з геномом вірусного білка (VPg), а-протеаза ядерного включення (NIa-Pro), ядерне включення b (NIb) і білок оболонки (CP) [Помилка! Джерело посилання не знайдено.]. Крім того, цистрон P3 містить мотив ковзання полімерази (GAAAAAA), який полегшує експресію другого короткого поліпептиду. Цей поліпептид гідролізується на три зрілі білки: P1, HC-Pro і P3 N-термінальний, злитий з інтригуючим Potyviridae ORF (P3N-PIPO), який має окремий С-кінцевий домен, але той самий N-кінцевий домен, що й P3 [87;88]. Ці білки працюють подібно до білків їхніх аналогів роду Potyvirus [89]. Крім того, частковий гідроліз в інфікованих вірусом клітинах продукує такі попередники, як P1-HC-Pro, 6K2-

VPg і Р3-6К1 [90;91]. Ці прекурсори можуть мати вирішальне значення для поширення вірусів. У той час як Р3 пов'язаний з реплікацією вірусу, системною інфекцією та міжклітинною мобільністю, розщеплення Р1 може мати дві функції у вірусній інфекційності, і було продемонстровано, що NS-Pro відіграють роль у переміщенні вірусів і передачі попелиці [92;93]. Крім того, було продемонстровано, що білок 6К2 необхідний для створення комплексу реплікації вірусу [94], що VPg зв'язує еукаріотичний фактор ініціації трансляції 4E (eIF4E) та його ізоформу eIF(iso)4E та покращує трансляцію вірусу в рослини [95], і що зв'язування 6К1 з мембраною є важливим для руху вірусу між клітинами та реплікації [96].

2.1.2. Структура геному BSMV і BSMNV

Попелиця, насіння, пилок і механічне тертя є засобами, за допомогою яких BSMV і BSMNV можуть поширюватися [97;98]. Залежно від штаму вірусу та різновиду хазяїна, швидкість передачі насіння BSMV може коливатися від 3% до 95%. Основним ресурсом вірусу в полі та однією з головних причин глобальної епідемії BSMV є висока швидкість передачі насіння. Хоча він може проникати в насіння (ембріони) видів квасолі з високим рівнем передачі, BSMV обмежений оболонкою насіння сортів квасолі з помірним рівнем передачі. BSMV зазвичай інфікує насіння через ендосперм. Тим не менш, пилок також можна використовувати для зараження насіння. За ідеальних умов вирощування насіння BSMV може зберігатися понад 30 років. Ген (гени), відповідальний за передачу насіння, а також молекулярні механізми, що лежать в основі передачі насіння, поки що невідомі [99]. Встановлено, що 36 попелиць 21 виду, включаючи *Myzus persica*, *Aphis craccivora*, *Aphis fabae* та *Acyrtosiphon pisum*, ефективно поширюють BSMV. Дослідження показали, що попелиця вважає BSMV-інфіковані рослини більш привабливими, ніж здорові рослини [Помилка! Джерело посилання не знайдено.], припускаючи, що BSMV може змінювати шлях жасмонової кислоти, щоб послабити захист рослин від комах і, отже, принести користь переноснику попелиці. Механічна інокуляція є ще одним

способом поширення BCMV на молоді рослини. Морфологія та характеристики рослин, включаючи відкладення калози, складчасті, скручені та пожовклі листя, а також варіації щільності залозистих трихом і товщини листя, можуть бути спричинені інфекцією патогена. Ці модифікації можуть вплинути на те, як комахи-переносники живляться та поширюються на рослини-господарі. Більшість вірусів можуть спричинити пожовтіння або блідо-зеленість листя-господаря.

2.1.3. Структура геному BCMV і BCMNV

Drifjhout класифікував BCMV на сім патотипів, а саме I–VII, на основі симптомів BCMNV та BCMV на одинадцяти сортах квасолі (Dubbele Witte (DW), Stringless Green Refugee (SGR), Redland's Greenleaf "C" (RGLC), Redland's Greenleaf " B" (RGLB), Sanilac, UI35, IVT-7214, Jubila, Amamda, US1006 і IVT7233). Різні штами одного і того ж патогенного типу потенційно можуть викликати різні симптоми. Наприклад, штами BCMV патогенного типу PG I 3PF і A1 викликають незначну мозаїку на «DW», але штам A1 потенційно може викликати системний некроз на «DW», що призводить до загибелі рослин [101;102]. Очевидно, що не всі патотипи добре вивчені, і в майбутньому можуть бути знайдені додаткові патотипи.

На основі серологічних реакцій ізоляти ЦМВ були розділені на два серотипи, серотипи А і В [103]. Усі ізоляти інших патотипів, таких як CH2, NL1, NL4, NL6, NL7, PR1, RU1 та US1–US10, включені до серотипу В, тоді як патотипи III та VI, які викликають чутливі до температури некротичні плями на рослинах квасолі, що містять ген I, включаючи TN1, NL3, NL5 і NL8, включені в серотип А. Пізніше аналіз послідовності генів і високоефективна рідинна хроматографія (HPLC) показали, що серотипи А і В походять від різних видів вірусів [Помилка! Джерело посилання не знайдено.]. Міжнародний комітет з таксономії вірусів (ICTV) пізніше назвав вірус вірусом звичайного мозаїчного некрозу квасолі (BCMNV) на основі звичайних симптомів вірусу та серологічних ознак. На підставі послідовностей генома та серологічних ознак кілька

потівірусів, що інфікують сою, включаючи вірус мозаїки вігни (ВІСМV), вірус мозаїки квасолі азуки (AzMV), вірус арахісової смуги (PStV) і вірус мозаїки, що переноситься коров'ячою попелицею (СABMV), нещодавно були класифіковані як штами ВСМV [104].

Існує багато ізолятів ВСМV і ВСМNV, але немає єдиного методу ідентифікації штамів ВСМV в Китаї та інших країнах. Вісімдесят шість повнорозмірних геномів ВСМV наразі доступні в базі даних GenBank; сім із вігни (*Vigna unguiculata*), один із ямсових бобів (*Pachyrhizus erosus*), один із фазеолусу ріукіуенсіса (*Vigna riukenensis*), двадцять вісім із звичайної квасолі (*Phaseolus vulgaris*), один із звичайної нандіни (*Nandina domestica*), два з квасолі мунг (*Vigna radiata*), один з кунжуту (*Sesamum indicum* L.), один з бобів азуки (*Abrus precatorius* L.), один з тристулкової кудранії (*Cudrania tricuspidate*), тридцять два з сої (*Glycine max*), два з арахіс (*Arachis hypogaea*), один з гіацинтових бобів (*Lablab purpureum*) і один з пурпурових кущових бобів (*Macroptilium atropurpureum*) (Додаток В і Д). Відповідно до філогенетичного аналізу китайські ізоляти ВСМV, що походять із сої, коров'ячого гороху, арахісу, кунжуту та ямсу, згруповані в одну кладу. Один зразок сої та чотири ізоляти коров'ячого гороху з Китаю утворили кластер, тоді як один штам бобів мунг утворив кластер з іншою лінією. Один штам коров'ячого гороху з Ірану та ізоляти звичайної квасолі з Танзанії, Південної Кореї, Колумбії, Ірану, Південної Кореї та Сполучених Штатів були згруповані разом в одній кладі. Ізоляти ВСМV з пурпурової кущової квасолі, вігни, квасолі азуки, квасолі мунг, звичайної нандіни та трикуспідальної кудранії були знайдені в іншій кладі. США, Мексика, Австралія, Німеччина, Іран, Танзанія та азійські країни, такі як Китай, Японія, Південна Корея та Індія, є одними з багатьох місць, де можна знайти членів цієї класифікації. Двадцять два повних геноми ВСМNV доступні в базі даних GenBank: один із Fabaceae (*Fabaceae* Lindl.), один із бенту (*Nicotiana benthamiana*) та дев'ятнадцять із звичайної квасолі (*Phaseolus vulgaris*) [105].

На основі філогенетичного аналізу було виявлено, що ці ізоляти BCMNV згруповані у дві основні клади: індійський ізолят зі звичайної квасолі був включений в одну кладу, тоді як ізолят BCMNV, що залишився, був знайдений в інший (рис. 2.1). Швидше за все, Південна та Східна Азія є місцем, де вперше з'явилася лінія BCMV. Іспанія вперше запропонувала послідовність BCMV у 1992 році, тоді як США вперше надали послідовність BCMNV у 1995 році [106]. Ізоляти BCMV від одного хазяїна зазвичай виявляють сильний генетичний зв'язок. Водночас спостережуване розміщення штамів BCMV у кластерах тісно пов'язане з територією, що свідчить про високу частоту обміну генами між штамами в межах однієї нації чи території і навпаки.

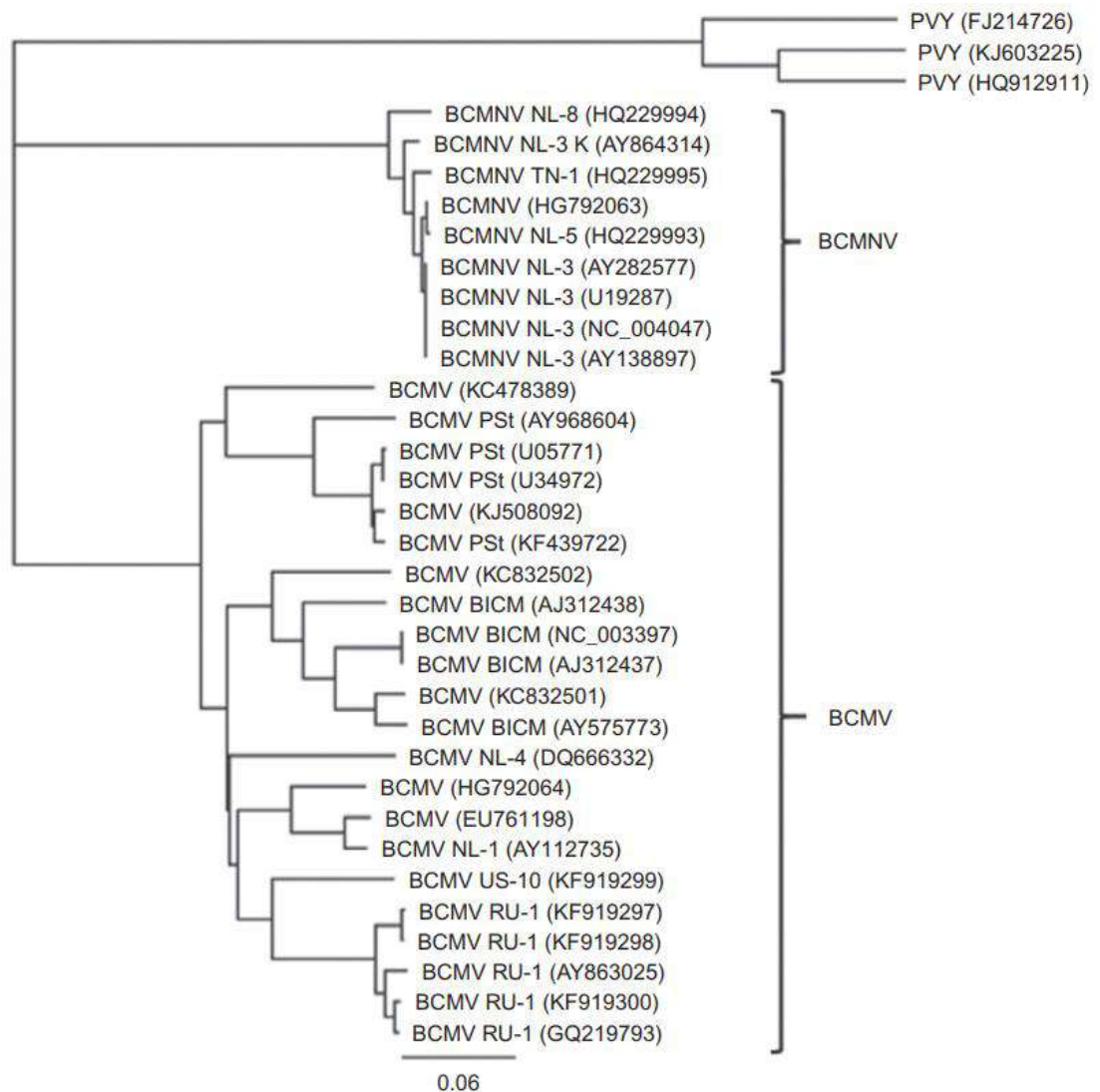


Рис. 2.1. Філогенетичне дерево вірусу мозаїки квасолі (BCMV) і квасолі звичайної вірус мозаїчного некрозу (BCMNV). Було знайдено дев'ять

повнорозмірних геномних послідовностей BCMNV і 22 для BCMV. BCMNV утворює щільний кластер без особливих варіацій BCMV показує більшу різноманітність. Було створено сусіднє філогенетичне дерево за допомогою Geneious Tree builder (параметри Tamura-Nei за замовчуванням). Шкала: 0,06 нуклеотиду заміни на сайт. Аналіз на основі повних геномів, доступних через GenBank (вересень 2014 р.) та позагруповий Potato virus Y (PVY) [113].

2.2. Методи ізоляції та очищення антигенів

Для таких застосувань, як поверхневий плазмонний резонанс (SPR), які потребують зразків високої чистоти для точного аналізу взаємодії, розділення та очищення антигенів від вірусів рослин є важливим. Щоб успішно ідентифікувати та очистити ці вірусні антигени та переконатися, що вони придатні для SPR-досліджень, було розроблено низку методів.

2.2.1. Гомогенізація та екстракція

Початковий етап ізоляції вірусів рослин включає гомогенізацію інфікованих тканин рослин має вирішальне значення для забезпечення ефективного вивільнення вірусних частинок із заражених рослинних тканин. Цей процес зазвичай включає два основних компоненти: приготування буфера та гомогенізацію.

1. Підготовка буфера

Ключем до максимального вилучення вірусних частинок є вибір буфера. Цитрат калію є часто використовуваним буфером для цієї мети і має такі властивості:

Контроль рН: Калій цитрат, якщо рН уже було знижено до 7,1, що ідеально підходить для збереження стабільності вірусних частинок під час екстракції.

Додатково:

Сульфат натрію: ця речовина призначена для збереження вірусних білків недоторканими під час екстракції, запобігаючи окислювальному розкладанню.

Етилендіамінтетраоцтова кислота, або ЕДТА, руйнує клітинні структури, утворюючи хелати іонів двовалентних металів, які можуть дестабілізувати клітинні мембрани та сприяти вивільненню вірусних частинок.

2. Процес гомогенізації

Наступним кроком є гомогенізація заражених рослинних тканин після створення буфера. Щоб вивільнити вірусні частинки в розчин і зруйнувати клітинний матрикс, цей крок є важливим:

Підготовка тканини: щоб забезпечити ефективну гомогенізацію, заражені рослинні тканини зазвичай подрібнюють на дрібні шматочки.

Процес змішування: за допомогою ступки та товчачика або гомогенізатора фрагменти тканини змішуються з підготовленим буфером. Це механічне порушення сприяє вивільненню вірусних частинок та підвищеній доступності, тобто вірусні частинки можна легше виділити та очистити на наступних стадіях шляхом утворення однорідної суміші.

Процес гомогенізації та екстракції є основоположним кроком у виділенні вірусів рослин. Цей початковий крок закладає основу для наступних методів, які підвищують чистоту та якість виділених антигенів

2.2.2. Ультрацентрифугування

Ультрацентрифугування — центрифугування, що розділяє частинки на основі щільності та розміру. Стандартне рівняння для швидкості осадження:

$$v = \frac{dr}{dt} = \frac{d_p^2 (\rho_p - \rho_m) \omega^2 r}{18\eta}$$

Тут d_p вказує на діаметр частинок; ρ_p : щільність частинок; ρ_m : середньої щільності; $\omega^2 r$: відцентрова сила; η : в'язкість середовища [107]. Коли різниця між розмірами частинок (d_p) і щільністю (ρ_p) досить велика, тобто між розчинним білком і клітинами, вони, ймовірно, не забруднюватимуть одна одну. Коли відмінності невеликі, тобто між вірусами, EV та білковими агрегатами [108], для підвищення ефективності розділення необхідне градієнтне середовище (тобто сахароза, йодиксанол, сорбіт, хлорид цезію тощо) [107]. Часто щільність і

плавучість вірусів настільки тісно збігаються з екзосомами, що навіть поділ за допомогою градієнтів щільності є непрактичним і призводить до спільної ізоляції їхніх РНК, що знаходяться в оболонці.

2.2.3. Хроматографія

Очищення вірусу часто здійснюється за допомогою ексклюзивної хроматографії (SEC), іонообмінної хроматографії (ІЕС) і афінної хроматографії (АС). У той час як більші частинки, як-от віруси або EV, подорожують значно швидше та можуть бути вилучені під час потоку, менші розчинні білки та нуклеїнові кислоти утримуються смолою в SEC. Плата є основою для поділу в ІЕС. Позитивно заряджені частинки утримуються катіонообмінними смолами, а негативно заряджені — аніонообмінними смолами. SEC часто видаляє як білок, так і ДНК, тоді як ІЕС переважно видаляє ДНК (через аніонний обмін). Між попередніми процесами прозорості та концентрації (шляхом мікрофільтрації, центрифугування) та кінцевої концентрації (шляхом TFF, центрифугування), SEC та ІЕС часто використовуються в тандемі під час етапу полірування зразка.. У результаті забруднюючі речовини з наведених РНК, ймовірно, будуть спільно ізольовані SEC та ІЕС. [109].

Найбільш селективним і адаптованим типом рідинної хроматографії є афінна хроматографія, яка залежить від специфічного та оборотного зв'язування білка з його спорідненим лігандом, такого як зв'язування антитіла з антигеном-мішенню, взаємодія ферменту з його субстратом або зв'язування гормону з його рецептором. Імобілізуючи один із взаємодіючих агентів, відомий як «афінний ліганд», на колонці як опору нерухомої фази, афінна хроматографія використовує специфічність цієї взаємодії. За допомогою вибіркового поглинання, опосередкованого афінним лігандом, цільовий білок екстрагується зі складної суміші. Цільовий білок (наприклад, плазма або бактеріальна культура) додається до складної суміші в рухомій фазі з належним рН і складом для зв'язування цільового білка з афінним лігандом, дозволяючи іншим компонентам протікати. Потім ціль, яка була збережена, елююється з колонки.

Афінність взаємодії мішені та ліганду визначає найкращу техніку елюції мішені. Колонці дають час для регенерації після елюювання перед нанесенням наступного зразка [110].

2.2.4. Центрифугування в градієнті щільності для розділення вірусних частинок

Центрифугування в градієнті щільності є життєво важливою технікою у вірусології для очищення вірусних частинок, у тому числі від вірусів рослин, таких як вірус картоплі Y (PVY) і вірус тютюнової мозаїки (TMV). У цьому методі використовується градієнт щільності, який зазвичай створюється за допомогою хлориду цезію (CsCl), для розділення вірусних частинок на основі їхньої плавучої щільності.

Центрифугування в градієнті щільності працює на основі обертання зразка в центрифугі для отримання градієнта щільності в розчині. Компоненти суміші рухаються по градієнту, коли зразок піддається дії високих відцентрових сил, поки їх густина не зрівняється з густиною навколишнього середовища. Це забезпечує ефективне розділення на основі розміру та щільності.

Градієнти CsCl: оскільки він створює постійний градієнт під час центрифугування, часто використовується хлорид цезію. Вірусні частинки можна ефективно відокремити від клітинного сміття та інших забруднюючих речовин завдяки високій щільності CsCl [111].

Розділення за плавучою щільністю: через різну плавучу щільність віруси можна легко виділити шляхом формування окремих смуг у певних місцях градієнта.

- Приготування градієнта CsCl:

CsCl розчиняють у буфері для створення розчинів різної щільності (наприклад, 1,20 г/мл, 1,45 г/мл і 1,60 г/мл). Ці розчини шарують у центрифужних пробірках для утворення безперервного градієнта.

- Завантаження зразка:

Гомогенізований вірусний препарат обережно шарують поверх градієнта CsCl, не порушуючи шари.

- Центрифугування:

Пробірки центрифугують на високих швидкостях (наприклад, 100 000 g) протягом кількох годин. Протягом цього часу вірусні частинки мігрують крізь градієнт, поки не досягнуть свого положення рівноваги на основі плавучої щільності.

- Збір фракції:

Після центрифугування можна спостерігати чіткі смуги, що відповідають різним вірусним частинкам. Ці смуги збирають за допомогою шприца або піпетки. Зібрані фракції часто піддають діалізу для видалення CsCl та будь-яких залишкових домішок (рис. 2.2).

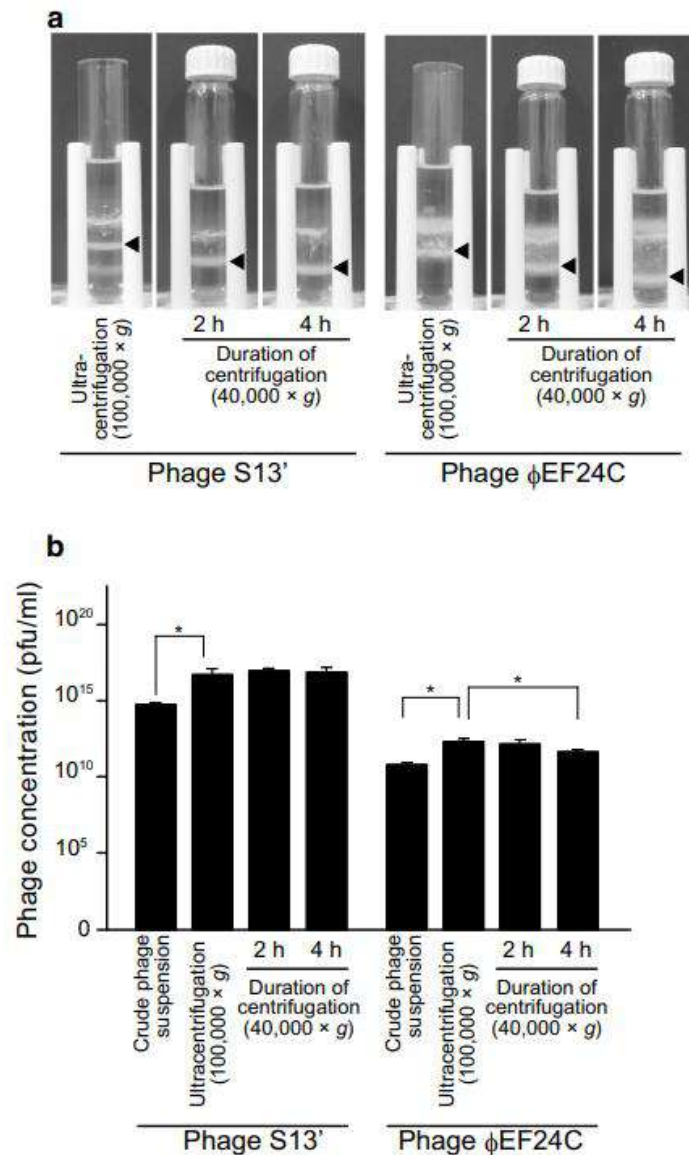


Рис 2.2. Очищення вірусу центрифугуванням у градієнті щільності CsCl. Неочищені суспензії фагів S13' і φEF24C очищали за допомогою Ультрацентрифування в градієнті щільності CsCl (100 000 × g, 1 год, 4 °C) і загальне центрифугування (40 000 × g, 2 години та 4 години, 4 °C). (a) Спостереження смуг вірусу після ультрацентрифування в градієнті щільності CsCl і загальне центрифугування. Чорні стрілки вказують на фагові смуги. Ліворуч і праворуч показані смуги фагів S13' і φEF24C стовпців відповідно. (b) Концентрації фагових смуг. Фаг смугу збирали з кожної пробірки, а концентрацію фага визначали вимірюваннями. Гістограма зі смугою помилок вказує на середнє значення з стандартне відхилення. Концентрації очищених

фагів S13' і фEF24С показані в лівому і правому стовпчиках відповідно. Статистична значущість позначена зірочками ($P < 0,05$; $n = 6$) [111].

Центрифугування в градієнті щільності може досягти високого рівня чистоти для ізольованих вірусів, що робить його придатним для застосувань, які вимагають чистих вірусних препаратів. Цей метод можна адаптувати для очищення різних типів вірусів, у тому числі з різними фізичними властивостями.

Використовуючи різницю в плавучій щільності, ця техніка дозволяє ефективно ізолювати та очищати різні віруси рослин, включаючи BCMV, BCMNV, SMV. Незважаючи на обмеження щодо обладнання та часу, його здатність виробляти високочисті вірусні препарати робить його безцінним у вірусологічних дослідженнях і застосуваннях, таких як поверхневий плазмонний резонанс (SPR).

2.3. Методологія поверхневого плазмонного резонансу

Вірус звичайної мозаїки квасолі (BCMV), вірус звичайного мозаїчного некрозу квасолі (BCMNV) і вірус мозаїки сої (SMV) можна виявити в ліофілізованих зразках за допомогою чутливого оптичного методу, відомого як поверхневий плазмонний резонанс (SPR).

2.3.1 Принцип SPR

Основою SPR є ідея повного внутрішнього відбиття (TIRF), яка стверджує, що світло, що проходить крізь оптично щільний матеріал (наприклад, скло), відбиватиметься назад, коли досягне поверхні розділу з менш оптично щільним матеріалом (наприклад, рідиною).

Зокрема, падаюче світло поляризується в приладах SPR, таких як пристрої Плазмотест, а інтерфейс складається з датчика, покритого електропровідним металевим шаром (зазвичай золотим через його стабільність). Передача енергії відбувається, коли поляризоване світло потрапляє на поверхню датчика, утворюючи плазмони — хвилі густини заряду електронів. Це знижує інтенсивність відбитого променя, який детектується під певним кутом (резонансним кутом) на детекторі [114].

Коли ліганд на сенсорі іммобілізований і піддається впливу вільного аналіту в розчині, показник заломлення біля поверхні сенсора змінюється в результаті зв'язування аналіту. Моніторинг взаємодії молекул у реальному часі стає можливим завдяки результуючому зсуву резонансного кута, який пропорційний масі на поверхні сенсора (рис. 2.3). Важливо, що SPR працює зі складними типами зразків, такими як сироватка крові та патогенний матеріал, оскільки світло не проходить через зразок [115].

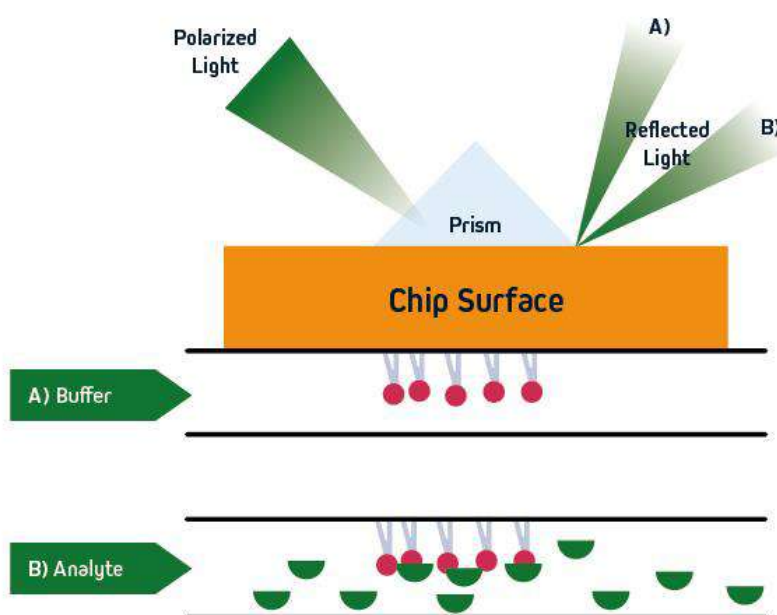


Рис. 2.3. Принципи SPR. Аналіт, який є вільним у розчині, захоплюється іммобілізованим лігандом у датчику, який приймає поляризоване світло. Моніторинг молекулярної взаємодії в режимі реального часу стає можливим завдяки зміні показника заломлення, спричиненій зв'язуванням аналіту поблизу поверхні сенсора.

2.3.2 Фази зв'язування – сенсограма

Вставлення датчика в пристрій і заправка мікрофлюїдної системи буфером є першими кроками в стандартному експерименті SPR. Потім за допомогою ковалентного зв'язку або методу захоплення ліганд — як правило, білок — вводять і фіксують на поверхні сенсора. Хоча тип датчика та умови іммобілізації (такі як тип покриття, концентрація ліганду, склад буфера та рН) завжди повинні

бути адаптовані до типу взаємодії, що досліджується, датчики на основі декстрану використовуються найчастіше. Потім дані передаються у формі сенсограмми, і починається обробка. Це відображає час на осі абсцис і відповідь зв'язування на осі у, як показано на рис. 2.4.

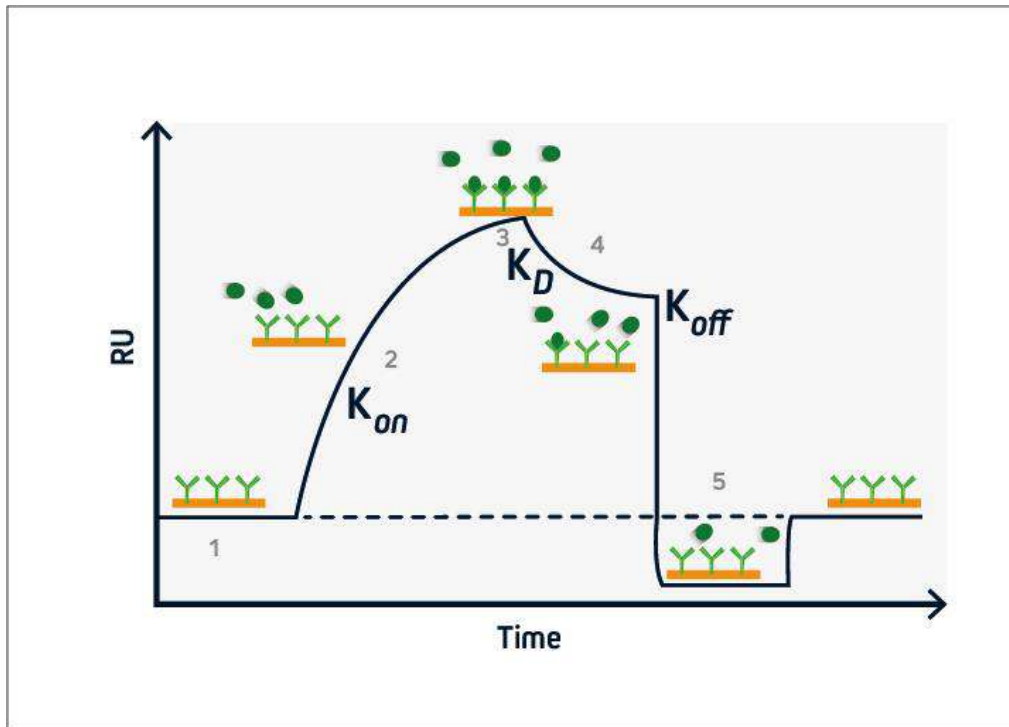


Рис 2.4. Типова сенсограмма. 1) базова лінія, 2) асоціація, 3) стаціонарний стан, 4) дисоціація, 5) регенерація.

Буфер протікає через поверхню датчика під час базової фази (1), кондиціонуючи датчик і дозволяючи побачити будь-які нестабільності. Це важливо, щоб гарантувати стабільну базову лінію та отримувати точні висновки. Коли аналіт додається в систему при $t = 0$, починається фаза асоціації (2). Швидкість асоціації (k_{on}) можна розрахувати за підвищенням сигналу, викликаного зв'язуванням аналіту на поверхні сенсора.

Константу рівноваги (K_D) можна розрахувати в стаціонарному стані (3), оскільки кількість аналіту, що асоціюється з лігандом і дисоціює від нього, однакова. Далі йде фаза дисоціації (4), під час якої розчин аналіту замінюється буфером і можна визначити швидкість дисоціації (k_{off}).

Якщо комплекс ліганд-аналіт має тривалий період напіврозпаду, може знадобитися фаза регенерації (5). Це включає в себе додавання розчину, щоб

порушити взаємодію ліганд-аналіт і відновити вихідний базовий рівень сигналу. Для регенерації сенсора часто використовуються розчини з високою концентрацією солі або низьким рН [116;117;118].

2.3.3 Методика виявлення BSMV, BCMNV та SMV

Позолочені сенсорні мікросхеми використовуються як підкладка для SPR. Чіпи функціоналізовані специфічними антитілами або аптамерами, які вибірково зв'язуються з BSMV, BCMNV або SMV.

Ліофілізовані зразки, що містять підозрювані вірусні частинки, відновлюють у відповідному буфері. Зразки можуть потребувати концентрації або очищення для підвищення чутливості виявлення. Підготовлений зразок вводять поверх функціонального сенсорного чіпа. Коли вірусні частинки зв'язуються з іммобілізованими антитілами, відбувається зміна показника заломлення, який вимірюється приладом SPR [119;120].

Відповідь SPR відстежується в режимі реального часу, що дозволяє проводити кінетичний аналіз взаємодій зв'язування. Дані аналізуються для визначення концентрації вірусних частинок на основі калібрувальних кривих, створених за відомими концентраціями. Щоб забезпечити точність і надійність, метод слід перевірити на традиційні методи, такі як ELISA або ПЛР.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Дослідження візуальних симптомів у рослин *Phaseolus vulgaris*, L сорту Пінто при інфікуванні *Bean common mosaic virus*

Найбільш активні роботи, що встановили властивості вірусних патогенів, які викликають захворювання квасолі, припадають на 70-80-ті роки. Отже, зовнішні симптоми захворювання, викликаного вірусами у квасолі (*Phaseolus vulgaris*, L), зараз добре описані. Тоді ж було виявлено широке розповсюдження на Європейському континенті захворювання квасолі під назвою «мозаїка», пізніше було ідентифіковано та досліджено збудника *Bean common mosaic virus*, BCMV, а хворобу названо «звичайною мозаїкою квасолі» [121].

Показано, що інфікування рослин BCMV може викликати у хазяїна два основних типи симптомів:

- «звичайна мозаїка», яка характеризується жилковим хлорозом і часто пов'язана з вадами розвитку листя (скручування);
- «чорний корінь», що пов'язаний із системним некрозом і загибеллю рослин.

Прояв симптомів залежить від штаму вірусу та генотипу хазяїна, таким чином, що деякі штами вірусу можуть інфікувати рослини безсимптомно [121]. Важливим висновком досліджень квасолі стало те, що вірусні інфекції передаються з насінням, при цьому вірус зосереджений у зародку, і до 83% насіння інфікованих рослин може передавати вірус нащадкам. Це сприяє надзвичайно широкому розповсюдженню патогену у світі, а він один із найпоширеніших вірусів рослин, що вражає бобові в природних умовах, причому звичайна квасоля є найбільш ураженим хазяїном [122,123].

Висока частота передачі через насіння є, мабуть, найважливішим фактором, що впливає на початкове зараження культур і поширення вірусу. Залежно від генотипу квасолі та досліджуваного штаму вірусу, до 83% насіння, виробленого інфікованими рослинами, можуть дати початок рослинам,

ураженим мозаїкою. Однак у деяких сортів передача насіння неефективна щодо деяких штамів вірусу. Так, сорт квасолі Пінто 114 має високу стійкість до зараження насіння штамом US 2. Передача вірусу насінням значно знижується у рослин, інфікованих після цвітіння, але важливо, що тривале зберігання насіння (до 30 років) на вірус помітно не впливає. Локалізується вірус переважно в ембріоні, в оболонці насіння він активується під час дозрівання насіння. Вважають, що вірус може потрапити в зародок через пилки уражених рослин [2].

Крім насіннєвої передачі зафіксовано і передачу вірусу з переносниками, в основному – попелицями, в період вегетації. Повідомлялося, що 36 попелиць з 21 роду, включаючи *Acyrtosiphon pisum*, *Aphis fabae*, *Myzus persica* та *Aphis craccivora* ефективно передають ВСМВ [123,124].

У наших дослідженнях виявили обидва типи симптомів вірусного інфікування на рослинах квасолі (*Phaseolus vulgaris*, L.). Зазвичай прояв симптомів вірусного інфікування рослин спостерігали при появі першої пари справжніх листків (рис 3.1).

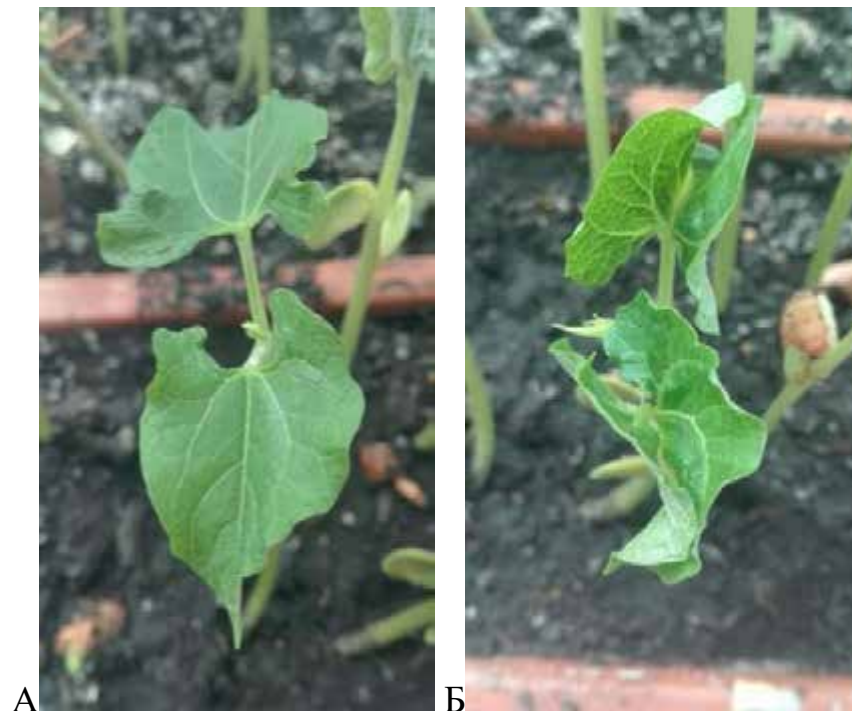


Рис. 3.1. Симптоми ураження квасолі ВСМВ на першій парі справжніх листків: А) здорова рослина; Б) рослина з симптомами скручування

На листках інфекція ВСМV проявлялася у вигляді зміни форми листкової пластинки: зморшкуватість, деформації жилок, а також некрози і мозаїка (рис.3.2).



Рис. 3.2. Системна інфекція ВСМV на рослинах квасолі: А) деформація листкової пластинки і прижилкові некрози на трійчастому листку; Б) мозаїка на першому справжньому листку і деформація

Відомо, що прояв інфекції ВСМV залежить від штаму вірусу та генотипу хазяїна і може сильно варіювати від дуже суворих симптомів, таких як складчастість і зморшкуватість та сильна міжжилкова мозаїка, аж до безсимптомної інфекції, яка характерна для деяких штамів вірусу. Деякі штамами ВСМV викликають втрату забарвлення стебла, призводять до системного некрозу і в'янення, а часто до відмирання усєї рослини [125].

Симптоми некротизації кореневої системи були виявлені при дослідженні рослин сорту Пінто як на кореневій системі, так і на стеблах (рис. 3.3).



Рис.3.3. Некротичні симптоми рослин квасолі (*Phaseolus vulgaris*, *L*) при інфікуванні BCMV: А) «чорний корінь»; Б) некрози на нижній частині стебла (стрілка)

Таким чином, дослідження симптоматики на рослинах квасолі сорту Пінто (*Phaseolus vulgaris*, *L*) при системному інфікуванні та передачі вірусної інфекції з насінням продемонстрували прояв вірусної інфекції, характерний для BCMV. Описи хвороби, приведені у літературі, підтверджують наші спостереження.

Для підтвердження інфекційної природи виявленого захворювання, проводили штучну інокуляцію безсимптомних рослин сорту Пінто інокулюмом із рослин з симптомами мозаїки та деформації першої пари листків. При появі нових трійчастих листків були виявлені симптоми мозаїки (рис. 3.4).



Рис. 3.4. Симптоми вірусного інфікування на листках штучно інфікованих рослин квасолі сорту Пінто: А) мозаїка на окремій частці трійчастого листка; Б) трійчастий листок із симптомами мозаїки

Таким чином, виявлені нами симптоми притаманні інфекційному захворюванню, а їх опис дозволяє стверджувати, що було виявлено інфекцію *Bean common mosaic virus*. Рослини квасолі, у яких виявлені симптоми при сходах і появі першої пари справжніх листків, є системно зараженими через інфіковане насіння, що характерно для даного вірусу. Штучна інокуляція інокулюмом з таких рослин дозволила перенести вірус на безсимптомні рослини, що підтверджує вірусну природу захворювання, а також накопичити вірус для подальших досліджень.

3.2. Порівняння методом ІФА збереженості *Bean common mosaic virus* у зневоднених зразках рослинного матеріалу за тривалого зберігання

Одержання і підготовка антигену для дослідження вірусвмісного матеріалу імунологічними методами пов'язані із збереженням антигенних властивостей капсидного білка вірусу, і, отже, необхідні дані щодо тривалого зберігання вірусів. Ця інформація може використовуватися у широкому спектрі галузей від створення трансформованих рослин до розробки методів виявлення вірусів [126,127]. Збереження антигену також важливе у біонанотехнології, де віруси можуть слугувати як векторами для трансгенного переносу генів, так і для отримання нанопрепаратів [128,129].

Оскільки віруси – це obligatні внутрішньоклітинні паразити і для їх реплікації необхідні живі клітини хазяїна, тому можливим є підтримування вірусів у живих рослинах з періодичним перенесенням інокулюму на молоді рослини. Листки таких рослин є відповідним позитивним контролем, їх можна використовувати для постановки реакцій з використанням ІФА. Проте цей метод може бути застосований лише при достатніх виробничих площах відповідно обладнаних вірусологічних теплиць, догляд за рослинами потребує затрат часу і робочої сили.

Відомо, що віруси можуть тривалий час зберігатися у ліофілізованому рослинному матеріалі, що є досить ошадними, не вимагає великих площ для вирощування рослин. Були дослідженні різні підходи для збереження вірусів рослин, які включають сублімаційне сушіння, дегідратацію шляхом фізичного сушіння та із застосуванням хімічних речовин, культура *in vitro*, заморожування і зберігання при мінусових температурах [130]. Усі ці методи мають як свої переваги, так і недоліки. Вважається сублімаційне сушіння, який представляє собою кілька етапний процес зневоднення, при якому вода видаляється з продукту, переходячи з льоду у пару. Сублімаційне сушіння – досить трудомісткий процес, який вимагає відповідного обладнання та навченого персоналу.

Використання заморожених зразків нетехнологічне: виникають проблеми з транспортуванням при комерційній реалізації, в лабораторних умовах

необхідно створювати аліквоти зразка, оскільки повторне заморожування знижує антигенну активність вірусу.

Культура інфікованих рослин *in vitro*, крім необхідності наявності відповідного обладнання і навченого персоналу, може з часом впливати на збереженість антигенів через використання відповідних регуляторів росту у культуральних середовищах.

Стосовно періоду збереження інфекційності вірусів при тривалому зберіганні, то повідомлялося, що вірус огіркової мозаїки, ліофілізований у листі або рослинному соку, міг зберігатися до 240 днів у захисному середовищі, що містить 5% (мас. / об.) сорбіту та 3,6% (мас. / об.) декстарну. Проте після цього періоду зберігання виявили лише 7% частоти зараження [131].

Також було описано протокол тривалого зберігання вірусу скручування листя картоплі (PLRV), S-вірусу картоплі (PVS) і віроїду веретеновидності бульб картоплі (PSTVd) у кріоконсервованих верхівках пагонів картоплі. Концентрації патогенів у інфікованих патогенами та відновленими після кріоконсервації пагонах, проаналізованих за допомогою ПЛР-ПЛР, були подібні до концентрацій у пагонах, які вирощувалися методом клонального мікророзмноження. Три патогени, що зберігалися в кріоконсервованих верхівках пагонів, легко передавалися рослинам картоплі шляхом щеплення та механічної інокуляції [132]. Цей метод має перспективи для тривалого збереження вірусу в умовах кріоконсервування, однак для відтворення інфікованих рослин необхідно час від кількох тижнів до кількох місяців. Цей метод може слугувати для підтримки культури вірусу, але для комерційного використання він непридатний, оскільки запит на діагностикум має виконуватися у найкоротший термін.

У наших дослідженнях ми здійснювали пошук найбільш оптимальної та ощадної технології збереження вірусніфікованого матеріалу для використання його в подальшому як позитивного контролю для ІФА.

Відмічені рослини квасолі сорту Пінто із симптомами, характерними для інфікування ВСМV, аналізували на вміст антигенів вірусу з використанням ІФА.

Встановлено, що вміст антигенів ВСМV у рослинах був на 40% вищим ніж у комерційному контролі з ліофілізованого рослинного матеріалу (рис.3.5).

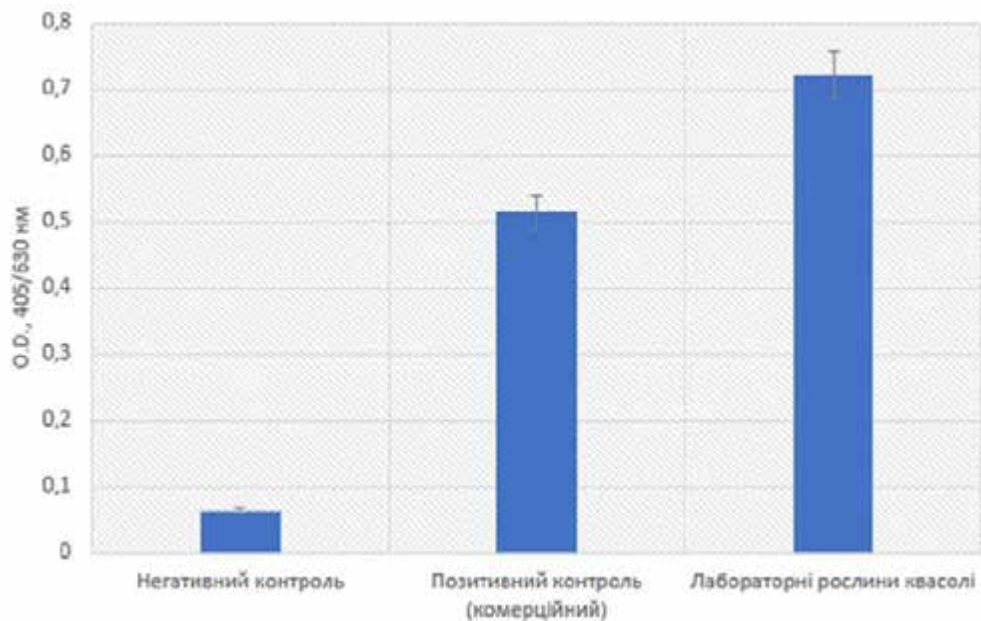


Рис. 3.5. Вміст антигенів ВСМV у листках рослин квасолі сорту Пінто, що культивували в лабораторних умовах

Зразки рослин, у яких виявили інфекцію *Bean common mosaic virus* були зневоднені описаним вище способом і зберігалися при +4 °C у закритих герметичних пробірках.

Наші дослідження збереження антигенів вірусу у ліофілізованих зразках після 9 місяців із застосуванням методу ІФА виявили досить високу антигенну активність таких препаратів. За даними ІФА, вміст антигенів становив 0,714 O.D., що відповідало рівню стандартного комерційного позитивного контролю (рис.3.6).

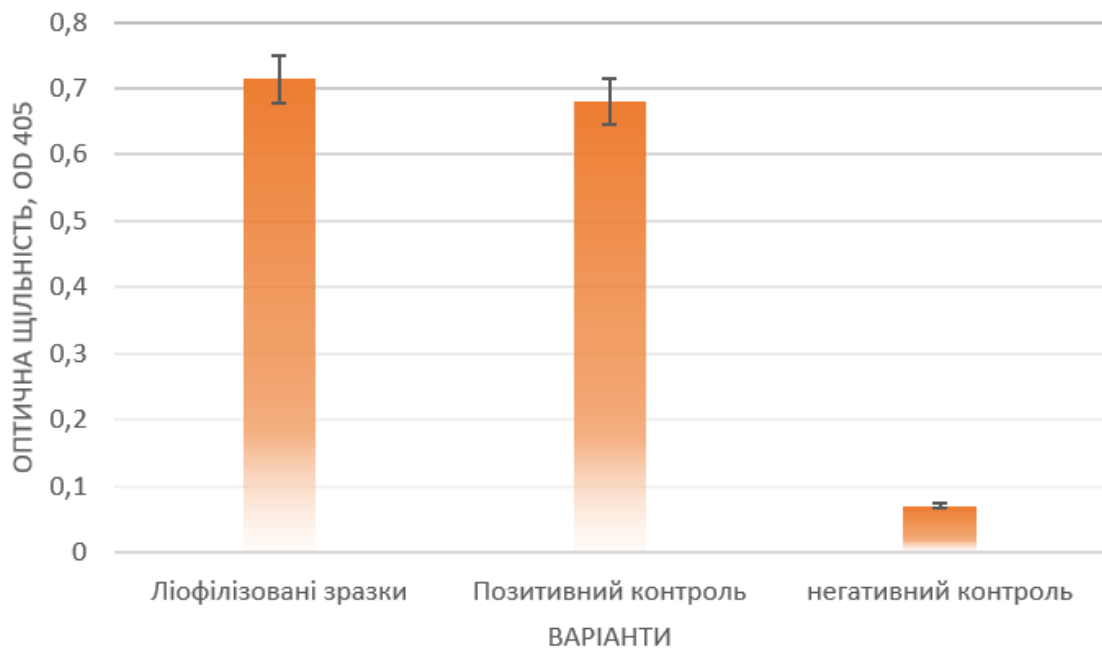


Рис.3.6. Результати ІФА ліофілізованих зразків рослин квасолі сорту Пінто із симптомами вірусного інфікування після 9 місяців зберігання на вміст антигенів ВСМV

Розроблена нами та оптимізована технологія створення позитивних контролів для діагностування вірусів методом ІФА дозволяє зберігати вірус тривалий час, досить з низькими затратами часу і коштів для її виконання. Подальші дослідження будуть зосередженні на вивченні збереження антигенних властивостей вірусомісного матеріалу в ліофілізованих зразках протягом більш тривалих часових термінів, а також на перевірці збереження вірулентності зразків щодо рослин хазяїв.

3.3. Дослідження зневоднених зразків квасолі, інфікованих ВСМV, після тривалого зберігання з використанням ППР-біосенсора

Використання безміткових методів для швидкого дослідження взаємодії між антитілами та антигеном є перспективним для вивчення нових штамів вірусів, а також для подальшого удосконалення системи діагностування вірусів різних організмів, у тому числі і вірусів рослин. Біосенсори на основі ППР є портативними приладами, що можуть бути застосовані як в лабораторних, так і в польових умовах, що робить їх перспективними для експресної діагностики.

Дослідження, проведені із використанням приладу «Плазмонтест» показали, що зв'язування антитіл до ВСМV на поверхні біосенсора спричиняло зміну резонансного кута з 62,8 град до 63,52 град, тобто різниця становила 0,72 град, що є добре реєстрованим і характеризує процес

Дослідження взаємодії «антиген-антитіло» на поверхні біосенсора у виявили зміни резонансного кута з 62,65 град до 63,1 град, таким чином, різниця становила 0,45 град, що є показником активного зв'язування між лігандом і аналітом на поверхні ППР-біосенсора (рис.3.7).

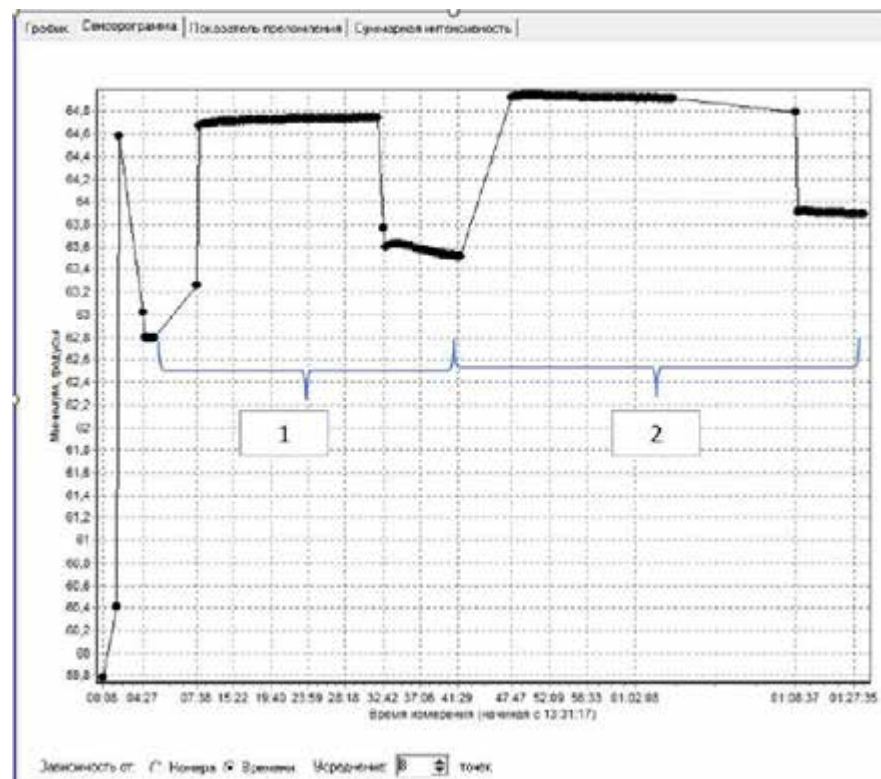


Рис. 3.7. Сенсограма зв'язування антитіл ВСМV з антигенами капсидного білка вірусу із зневоденого рослинного матеріалу: 1 – зв'язування антитіл на поверхні ППР-біосенсора; 2 – зв'язування антигенів вірусу з антитілами, іммобілізованими на поверхні біосенсора

Таким чином, на поверхні ППР-біосенсора реєструвалася взаємодія «антиген-антитіло» для антитіл до ВСМV та антигенів ВСМV. Це підтверджує збереження антигенних властивостей вірусу у зневоднених зразках після тривалого зберігання.

ВИСНОВКИ ТА ПРОПОЗИЦІЇ

1. Рослини квасолі сорту Пінто (*Phaseolus vulgaris*, L), у яких виявлені симптоми мозаїки, некрозів та деформації листків у сходів і при появі першої пари справжніх листків, є системно зараженими через інфіковане насіння. Це є характерною ознакою для вірусу звичайної мозаїки квасолі (BSMV). Штучна інокуляція інокулюмом з таких рослин дозволила перенести вірус на безсимптомні рослини, що підтверджує вірусну природу захворювання, а також накопичити вірус для подальших досліджень.
2. Дослідження збереження антигенів вірусу у зневоднених зразках після 9 місяців зберігання із застосуванням методу ІФА виявили досить високу антигенну активність таких препаратів. За даними ІФА, вміст антигенів становив 0,714 O.D., що відповідало рівню стандартного комерційного позитивного контролю. Таким чином, метод зневоднення можна використовувати для створення і тривалого зберігання препаратів вірусів для використання як позитивних контролів в методі ІФА.
3. Експресним методом з використанням ППР-біосенсору показана взаємодія «антиген-антитіло» для BSMV та специфічних до нього комерційних антитіл. Різниця резонансного кута була добре відтворювана, що свідчить про активну взаємодію між аналітом та лігандом, а також підтверджує дані, одержані при аналізі зразків методом ІФА. Таким чином, ППР-біосенсор можна використовувати для вивчення збереження антигенних властивостей вірусів після тривалого зберігання.

Розроблені технологічні підходи для створення позитивних контролів із застосуванням у виконанні аналізів методом ІФА. Ці діагностикуми можна використовувати у тестуванні рослинного матеріалу на вміст антигенів вірусів і перспективними є подальші розробки діагностикумів до важливих вірусів сільськогосподарських культур.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Applications of Surface Plasmon Resonance and Biolayer Interferometry for Virus–Ligand Binding / Shruthi Murali ORCID, Richard R. Rustandi, Xiwei Zheng, Anne Payne and Liang Shang *Viruses* 2022, 14(4), 717;
2. Mayo M. A., Pringle C. R. Virus taxonomy-1997 // *Journal of General virology*. – 1998. – Т. 79. – №. 4. – С. 649-657.
3. Matthews, R.E.F. (1983a). The history of viral taxonomy. In: R.E.F. Mathews (ed.) *A Critical Appraisal of Viral Taxonomy*, pp. 1-35. CRC Press, Boca Raton, FL
4. Matthews, R.E.F. (1985a). Viral taxonomy. *Microbiol. Sci.* 2, 74-75.
5. Matthews R. E. F., Hull R. *Matthews' plant virology*. – Gulf professional publishing, 2002.
6. van Regenmortel, M.H.V. (1990). Virus species, a much overlooked but essential concept in virus classification. In *tervirology* 31, 241-254.
7. King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B., Lefkowitz, E.J., 2012. *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier, Amsterdam, 1327 pp.
8. Mateu M. G. *Introduction: the structural basis of virus function // Structure and physics of viruses: an integrated textbook*. – 2013. – С. 3-51.
9. Smith, K.M., 1937. *A Text Book of Plant Virus Diseases*. Churchill, London.
10. Smith, K.M., 1972. *A Textbook of Plant Virus Diseases*, third ed. Longmans Green, New York, NY.
11. Holmes, F.O., 1964. Symptomology of viral diseases in plants. In: Corbett, M.K., Sisler, H.D. (Eds.), *Plant Virology*. University of Florida Press, Gainesville, FL, pp. 17-38.
12. Hull, R., Davies, J.W., 1992. Approaches to nonconventional control of plant virus diseases. *Crit. Rev. Plant Sci.* 11, 17-33.

13. Waterworth, H.E., Hadidi, A., 1998. Economic losses due to plant viruses. In: Hadidi, A., Khetarpal, R.K., Koganezawa, H. (Eds.), *Plant Virus Disease Control*. APS Press, St Paul, MN, pp. 1-13.
14. Hull R., Davies J. W. Approaches to nonconventional control of plant virus diseases // *Critical Reviews in Plant Sciences*. – 1992. – T. 11. – №. 1. – C. 17-33.
15. Thresh J. M., Cooter R. J. Strategies for controlling cassava mosaic virus disease in Africa // *Plant pathology*. – 2005. – T. 54. – №. 5. – C. 587-614.
16. Prins M., Goldbach R. The emerging problem of tospovirus infection and nonconventional methods of control // *Trends in microbiology*. – 1998. – T. 6. – №. 1. – C. 31-35.
17. Mateu M. G. Introduction: the structural basis of virus function // *Structure and physics of viruses: an integrated textbook*. – 2013. – C. 3-51
18. Agbandje-McKenna M. et al. Functional implications of the structure of the murine parvovirus, minute virus of mice // *Structure*. – 1998. – T. 6. – №. 11. – C. 1369-1381.
19. Carrillo-Tripp M. et al. VIPERdb2: an enhanced and web API enabled relational database for structural virology // *Nucleic acids research*. – 2009. – T. 37. – №. suppl_1. – C. D436-D442.
20. Harris A. et al. Influenza virus pleiomorphy characterized by cryoelectron tomography // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2006. – T. 103. – №. 50. – C. 19123-19127.
21. Mateu M. G. Introduction: the structural basis of virus function // *Structure and physics of viruses: an integrated textbook*. – 2013. – C. 3-51.
22. Castón, J. R., & Carrascosa, J. L. (2013). The Basic Architecture of Viruses. *Structure and Physics of Viruses*, 53–75
23. Clare D. K., Orlova E. V. 4.6 Å cryo-EM reconstruction of tobacco mosaic virus from images recorded at 300 keV on a 4k× 4k CCD camera // *Journal of Structural Biology*. – 2010. – T. 171. – №. 3. – C. 303-308.

24. Agbandje-McKenna M. et al. Functional implications of the structure of the murine parvovirus, minute virus of mice //Structure. – 1998. – T. 6. – №. 11. – C. 1369-1381.
25. Harris J. R. (ed.). Subcellular Biochemistry: Ascorbic Acid: Biochemistry and Biomedical Cell Biology. – Springer Science & Business Media, 2013. – T. 25.
26. Koenig R. ELISA in the study of homologous and heterologous reaction of plant viruses. J Gen Virol. 1978; 40: 309-318.
27. Lin NS, Hsu YH, Hsu HT. Immunological detection of plant viruses and mycoplasma-like organism by direct tissue blotting on nitrocellulose membranes. Phytopathology. 1990; 80: 824-828.
28. Makkouk KM, Kumari SG. Detection of ten viruses by the tissue-blot immunoassay (TBIA). Arab J Plant Protection. 1996; 14: 3-9.
29. Hamza KA, Abd El-Aziz MH, Behiry SI, Younes HA. Isolation and purification of potato virus Y isolate infecting potato (*Solanum tuberosum* L.) in al-nubaria region. Middle East J Agri Res. 2018; 7: 1201-1207.
30. Younes HA, Aseel DG, Abd El-Aziz MH. Identification and purification of cowpea mosaic comovirus isolated from infected cowpea (*Vigna unguiculata* L.) in northern Egypt. Int J Agri Environ Res (IJAER). 2018; 4: 206-212.
31. Hawkes R, Niday E, Gordon J. A dot-immunobinding assay for monoclonal and other antibodies. Anal Biochemical. 1982; 119: 142-147.
32. Berger P. H., Thornbury D. W., Pirone T. P. Detection of picogram quantities of potyviruses using a dot blot immunobinding assay //Journal of virological methods. – 1985. – T. 12. – №. 1-2. – C. 31-39.
33. Fegla G. I. et al. Comparative studies for detection of Tomato mosaic tobamovirus (ToMV), Cucumber mosaic cucumovirus (CMV) and Potato Y potyviruses (PVY) //Adv Agric Res. – 2001. – T. 6. – C. 239-254.
34. Hsu H. T., Lawson R. H. Direct tissue blotting for detection of tomato spotted wilt virus in Impatiens. – 1991.

35. Lina Katul V, Naiss HJ, Makkouk KM, Lesemann DE, Casper R. Characterization and serology of virus-like particles associated with faba bean necrotic yellows. *Ann Appl Biol.* 1993; 123: 629-647.
36. Sherwood JL. Comparison of a filter paper immunobinding assay, western blotting and an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of wheat streak mosaic virus. *J Phytopathol.* 1987; 118: 68-75
37. Abd El-Aziz M. H. Three modern serological methods to detect plant viruses // *Journal of Plant Science and Phytopathology.* – 2019. – T. 3. – №. 3. – С. 101-106.
38. Saiki, R. K., Gelfand, G. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G., et al. 1988. Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-9
39. Arnheim, N., Erlich, H. 1992. Polymerase chain reaction strategy. *Annu. Rev. Biochem.* 61:131-56
40. Bej, A. K., Mahbubani, M. H. 1992. Applications of the polymerase chain reaction in environmental microbiology. *PCR Methods Appl.* 1:151-59
41. Henson J. M., French R. C. The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis // *Papers in Plant Pathology.* – 1993. – С. 2.
42. Gulati N. M. et al. Cryo-electron tomography investigation of serum albumin-camouflaged tobacco mosaic virus nanoparticles // *Nanoscale.* – 2017. – Т. 9. – №. 10. – С. 3408-3415.
43. Gallagher, J. R. , McCraw, D. M. , Torian, U. , Gulati, N. M. , Myers, M. L. , Conlon, M. T. , & Harris, A. K. (2018). Characterization of hemagglutinin antigens on influenza virus and within vaccines using electron microscopy. *Vaccines*, 6, E31.
44. Lynch, A. , Meyers, A. E. , Williamson, A. L. , & Rybicki, E. P. (2012). Stability studies of HIV-1 Pr55gag virus-like particles made in insect cells after storage in various formulation media. *Virology Journal*, 9, 210.
45. Pappas, N., Roux, S., Hölzer, M., Lamkiewicz, K., Mock, F., Marz, M., & Dutilh, B. E. (2020). *Virus Bioinformatics. Reference Module in Life Sciences.*

46. Kretschmann, E.; Raether, H. Notizen: Radiative Decay of Non Radiative Surface Plasmons Excited by Light. *Z. Nat. A* 1968, 23, 2135–2136.
47. Kretschmann, E. Decay of non radiative surface plasmons into light on rough silver films. Comparison of experimental and theoretical results. *Opt. Commun.* 1972, 6, 185–187.
48. Otto, A. Excitation of nonradiative surface plasma waves in silver by the method of frustrated total reflection. *Z. Phys. A Hadron. Nucl.* 1968, 216, 398–410
49. Homola, J. Present and future of surface plasmon resonance biosensors. *Anal. Bioanal. Chem.* 2003, 377, 528–539.
50. Couture, M.; Zhao, S.S.; Masson, J.-F. Modern surface plasmon resonance for bioanalytics and biophysics. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2013, 15, 11190–11216.
51. Wang, D.S.; Fan, S.K. Microfluidic Surface Plasmon Resonance Sensors: From Principles to Point-of-Care Applications. *Sensors* 2016, 16, 1175.
52. Prabowo, B.A.; Purwidyantri, A.; Liu, K.-C. Surface Plasmon Resonance Optical Sensor: A Review on Light Source Technology. *Biosensors* 2018, 8, 80.
53. De Crescenzo, G.; Woodward, L.; Srinivasan, B. Online optimization of surface plasmon resonance-based biosensor experiments for improved throughput and confidence. *J. Mol. Recognit.* 2008, 21, 256–266.
54. Mehand, M.S.; De Crescenzo, G.; Srinivasan, B. Increasing throughput of surface plasmon resonance-based biosensors by multiple analyte injections. *J. Mol. Recognit. JMR* 2012, 25, 208–215.
55. Si Mehand, M.; De Crescenzo, G.; Srinivasan, B. On-line kinetic model discrimination for optimized surface plasmon resonance experiments. *J. Mol. Recognit. JMR* 2014, 27, 276–284V
56. De Crescenzo, G.; Boucher, C.; Durocher, Y.; Jolicoeur, M. Kinetic Characterization by Surface Plasmon Resonance-Based Biosensors: Principle and Emerging Trends. *Cell. Mol. Bioeng.* 2008, 1, 204–215.

57. Vaisocherová, H.; Faca, V.M.; Taylor, A.D.; Hanash, S.; Jiang, S. Comparative study of SPR and ELISA methods based on analysis of CD166/ALCAM levels in cancer and control human sera. *Biosens. Bioelectron.* 2009, 24, 2143–2148.
58. Chavane, N.; Jacquemart, R.; Hoemann, C.D.; Jolicoeur, M.; De Crescenzo, G. At-line quantification of bioactive antibody in bioreactor by surface plasmon resonance using epitope detection. *Anal. Biochem.* 2008, 378, 158–165.
59. Jacquemart, R.; Chavane, N.; Durocher, Y.; Hoemann, C.; De Crescenzo, G.; Jolicoeur, M. At-line monitoring of bioreactor protein production by surface plasmon resonance. *Biotechnol. Bioeng.* 2008, 100, 184–188.]
60. Kretschmann, E.; Raether, H. Notizen: Radiative Decay of Non Radiative Surface Plasmons Excited by Light. *Z. Nat. A* 1968, 23, 2135–2136.
61. Kretschmann, E. Decay of non radiative surface plasmons into light on rough silver films. Comparison of experimental and theoretical results. *Opt. Commun.* 1972, 6, 185–187.
62. Gaudreault J. et al. On the use of surface plasmon resonance-based biosensors for advanced bioprocess monitoring //Processes. – 2021. – T. 9. – №. 11. – C. 1996.
63. Gaudreault J. et al. On the use of surface plasmon resonance-based biosensors for advanced bioprocess monitoring //Processes. – 2021. – T. 9. – №. 11. – C. 1996.
64. Schasfoort, R.B.M. Introduction to Surface Plasmon Resonance. In *Handbook of Surface Plasmon Resonance*, 2nd ed.; Schasfoort, R.B.M., Ed.; The Royal Society of Chemistry: London, UK, 2017; pp. 1–26.
65. Stenberg, E.; Persson, B.; Roos, H.; Urbaniczky, C. Quantitative determination of surface concentration of protein with surface plasmon resonance using radiolabeled proteins. *J. Colloid Interface Sci.* 1991, 143, 513–526.
66. Andersson, K.; Hämäläinen, M.; Malmqvist, M. Identification and Optimization of Regeneration Conditions for Affinity-Based Biosensor Assays. A Multivariate Cocktail Approach. *Anal. Chem.* 1999, 71, 2475–2481.

67. Goode, J.A.; Rushworth, J.V.H.; Millner, P.A. Biosensor Regeneration: A Review of Common Techniques and Outcomes. *Langmuir* 2015, 31, 6267–6276.
68. Myszka, D.G. Improving biosensor analysis. *J. Mol. Recognit. JMR* 1999, 12, 279–284.
69. Moyes DL, Naglik JR. (2012) Analysis of host-cell responses by immunoblotting, ELISA, and real-time PCR. *Methods Mol Biol.* 845:345–60. Originally published in 2014. Updated and republished in May 2017.
70. Brogioni, B., & Berti, F. (2014). Surface plasmon resonance for the characterization of bacterial polysaccharide antigens: a review. *MedChemComm*, 5(8), 1058.
71. Brogioni, B., & Berti, F. (2014). Surface plasmon resonance for the characterization of bacterial polysaccharide antigens: a review. *MedChemComm*, 5(8), 1058.
72. Mehand, M.S.; De Crescenzo, G.; Srinivasan, B. Increasing throughput of surface plasmon resonance-based biosensors by multiple analyte injections. *J. Mol. Recognit. JMR* 2012, 25, 208–215.
73. Forest-Nault, C.; Gaudreault, J.; Henry, O.; Durocher, Y.; De Crescenzo, G. On the Use of Surface Plasmon Resonance Biosensing to Understand IgG-Fc γ R Interactions. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 6616.
74. Cambay, F.; Henry, O.; Durocher, Y.; De Crescenzo, G. Impact of N-glycosylation on Fc γ receptor/IgG interactions: Unravelling differences with an enhanced surface plasmon resonance biosensor assay based on coiled-coil interactions. *mAbs* 2019, 11, 435–452.
75. Cambay, F.; Forest-Nault, C.; Dumoulin, L.; Seguin, A.; Henry, O.; Durocher, Y.; De Crescenzo, G. Glycosylation of Fc γ receptors influences their interaction with various IgG1 glycoforms. *Mol. Immunol.* 2020, 121, 144–158.
76. Karlsson, R.; Pol, E.; Frostell, Å. Comparison of surface plasmon resonance binding curves for characterization of protein interactions and analysis of screening data. *Anal. Biochem.* 2016, 502, 53–63.

77. Schoefield, D.J., Dimmock, N.J., 1996. Determination of affinities of a panel of IgGs and Fabs for whole enveloped (influenza A) virions using surface plasmon resonance. *J. Virol. Methods* 62, 33–42
78. Hardy S. A., Dimmock N. J. Valency of antibody binding to enveloped virus particles as determined by surface plasmon resonance // *Journal of virology*. – 2003. – T. 77. – №. 2. – C. 1649-1652.
79. Barton, E.S., Connolly, J.L., Forrest, J.C., Chappell, J.D., Dermody, T.S., 2001. Utilization of sialic acid as a coreceptor enhances reovirus attachment by multistep adhesion strengthening. *J. Biol. Chem.* 276 (3), 2200–2211
80. Abad, L.W., Neumann, M., Tobias, L., Obenauer-Kutner, L., Jacobs, S., Cullen, C., 2002. Development of a biosensor-based method for detection and isotyping of antibody responses to adenoviral-based gene therapy vectors. *Anal. Biochem.* 310, 107–113
81. Boltovets P. M. et al. Detection of plant viruses using a surface plasmon resonance via complexing with specific antibodies // *Journal of Virological Methods*. – 2004. – T. 121. – №. 1. – C. 101-106.
82. Ivanov, K.I.; Eskelin, K.; Lohmus, A.; Makinen, K. Molecular and cellular mechanisms underlying potyvirus infection. *J. Gen. Virol.* 2014, 95, 1415–1429.
83. Hull, R. *Plant Virology*; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2013.
84. Elsharkawy, M.M.; Shimizu, M.; Takahashi, H.; Ozaki, K.; Hyakumachi, M. Induction of systemic resistance against Cucumber mosaic virus in *Arabidopsis thaliana* by *Trichoderma asperellum* SKT-1. *Plant Pathol. J.* 2013, 29, 193.
85. Revers, F.; Garcia, J.A. Molecular biology of potyviruses. *Adv. Virus Res.* 2015, 92, 101–199.
86. Urcuqui-Inchima, S.; Haenni, A.L.; Bernardi, F. Potyvirus proteins: A wealth of functions. *Virus Res.* 2001, 74, 157–175.
87. Chung, Y.W.; Miller, W.A.; Atkins, J.F.; Firth, A.E. An overlapping essential gene in the Potyviridae. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2008, 105, 5897–5902.

88. Olsper, A.; Chung, Y.W.; Atkins, J.F.; Carr, J.P.; Firth, A.E. Transcriptional slippage in the positive-sense RNA virus family Potyviridae. *EMBO Rep.* 2015, 16, 995–1004.
89. Revers, F.; García, J.A. Molecular biology of potyviruses. In *Advances in Virus Research*; Karl, M., Thomas, C.M., Murphy, F.A., Eds.; Academic Press: Waltham, MA, USA, 2015; Volume 92, pp. 101–199.
90. Mäkinen, K.; Paulin, L.; Saarna, M. The nucleotide sequence of potato virus A genomic RNA and its sequence similarities with other potyviruses. *J. Gen. Virol.* 1994, 75, 457–461.
91. Kekarainen, T.; Merits, A.; Oruetxebarria, I.; Rajamäki, M.-L.; Valkonen, J. Comparison of the complete sequences of five different isolates of Potato virus A (PVA), genus Potyvirus. *Arch. Virol.* 1999, 144, 2355–2366.
92. Rojas, M.R.; Zerbini, F.M.; Allison, R.F.; Gilbertson, R.L.; Lucas, W.J. Capsid protein and helper component-proteinase function as potyvirus cell-to-cell movement proteins. *Virology* 1997, 237, 283–295. [Google Scholar] [CrossRef] [Green Version]
93. Jenner, C.E.; Tomimura, K.; Ohshima, K.; Hughes, S.L.; Walsh, J.A. Mutations in Turnip mosaic virus P3 and cylindrical inclusion proteins are separately required to overcome two *Brassica napus* resistance genes. *Virology* 2002, 300, 50–59
94. Wei, T.; Huang, T.-S.; McNeil, J.; Laliberté, J.-F.; Hong, J.; Nelson, R.S.; Wang, A. Sequential recruitment of the endoplasmic reticulum and chloroplasts for plant potyvirus replication. *J. Virol.* 2010, 84, 799–809
95. Revers, F.; Garcia, J.A. Molecular biology of potyviruses. *Adv. Virus Res.* 2015, 92, 101–199.
96. Moreno, M.; Bernal, J.J.; Jiménez, I.; Rodríguez-Cerezo, I. Resistance in plants transformed with the P1 or P3 gene of tobacco vein mottling potyvirus. *J. Gen. Virol.* 1998, 79, 2819–2827.

97. El-Sawy, M.A.; Mohamed, H.A.E.; Elsharkawy, M.M. Serological and molecular characterisations of the Egyptian isolate of Bean common mosaic virus. *Arch. Phytopathol. Plant Prot.* 2014, 47, 1431–1443
98. Pasev, G.; Kostova, D.; Sofkova, S. Identification of Genes for Resistance to Bean Common Mosaic Virus and Bean Common Mosaic Necrosis Virus in Snap Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Breeding Lines Using Conventional and Molecular Methods. *J. Phytopathol.* 2013, 162, 19–25.
99. Su, W. Molecular Identification and Analysis of the Complete Genome Sequences of Bean Common Mosaic Virus from Three Legumes. Master's Thesis, Shandong Agricultural University, Taian, China, 2013.
100. Mhlanga, N.M. Effects of Plant Viral Pathogens on Plant-Pollinator Relationships. Ph.D. Thesis, University of Cambridge, Cambridge, UK, 2020.
101. Feng, X.; Orellana, G.E.; Myers, J.R.; Karasev, A.V. Recessive Resistance to Bean common mosaic virus Conferred by the bc-1 and bc-2 Genes in Common Bean (*Phaseolus vulgaris*) Affects Long-Distance Movement of the Virus. *Phytopathology* 2018, 108, 1011–1018.
102. Feng, X.; Orellana, G.E.; Green, J.C.; Melzer, M.J.; Hu, J.S.; Karasev, A.V. A New Strain of Bean Common Mosaic Virus from Lima Bean (*Phaseolus lunatus*): Biological and Molecular Characterization. *Plant Dis.* 2019, 103, 1220–1227.
103. McKern, N.; Shukla, D.; Barnett, O.; Vetten, H.; Dijkstra, J.; Whittaker, L.; Ward, C. Coat protein properties suggest that azuki bean mosaic virus, blackeye cowpea mosaic virus, peanut stripe virus, and three isolates from soybean are all strains of the same potyvirus. *Intervirology* 1992, 33, 121–134.
104. Berger, P.; Wyatt, S.; Shiel, P.; Silbernagel, M.; Druffel, K.; Mink, G. Phylogenetic analysis of the Potyviridae with emphasis on legume-infecting potyviruses. *Arch. Virol.* 1997, 142, 1979–1999.
105. Tang M., Feng X. Bean common mosaic disease: etiology, resistance resource, and future prospects // *Agronomy*. – 2022. – T. 13. – №. 1. – C. 58.

106. Fang, G.W.; Allison, R.F.; Zambolim, E.M.; Maxwell, D.P.; Gilbertson, R.L. The complete nucleotide sequence and genome organization of bean common mosaic virus (NL3 strain). *Virus Res.* 1995, 39, 13–23.

107. Price C.A. *Centrifugation in Density Gradients*. Academic Press; New York, NY, USA: 1982.

108. Mateescu B., Kowal E.J.K., van Balkom B.W.M., Bartel S., Bhattacharyya S.N., Buzás E.I., Buck A.H., de Candia P., Chow F.W.N., Das S., et al. Obstacles and opportunities in the functional analysis of extracellular vesicle RNA—An ISEV position paper. *J. Extracell. Vesicles.* 2017;6:1286095. doi:10.1080/20013078.2017.1286095.

109. Zhou Y., McNamara R. P., Dittmer D. P. Purification methods and the presence of RNA in virus particles and extracellular vesicles // *Viruses*. – 2020. – T. 12. – №. 9. – C. 917.

110. Arora, S., Saxena, V., & Ayyar, B. V. (2017). Affinity chromatography: A versatile technique for antibody purification. *Methods*, 116, 84–94. doi:10.1016/j.ymeth.2016.12.0

111. Nasukawa, T., Uchiyama, J., Taharaguchi, S., Ota, S., Ujihara, T., Matsuzaki, S., ... Sakaguchi, M. (2017). Virus purification by CsCl density gradient using general centrifugation. *Archives of Virology*, 162(11), 3523–3528. doi:10.1007/s00705-017-3513-z

112. Wylie, S.J.; Adams, M.; Chalam, C.; Kreuze, J.; Lopez-Moya, J.J.; Ohshima, K.; Praveen, S.; Rabenstein, F.; Stenger, D.; Wang, A.; et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Potyviridae. *J. Gen. Virol.* 2017, 98, 352–354.

113. Worrall, E. A., Wamonje, F. O., Mukeshimana, G., Harvey, J. J. W., Carr, J. P., & Mitter, N. (2015). Bean Common Mosaic Virus and Bean Common Mosaic Necrosis Virus. *Advances in Virus Research*, 1–46. doi:10.1016/bs.aivir.2015.04.002

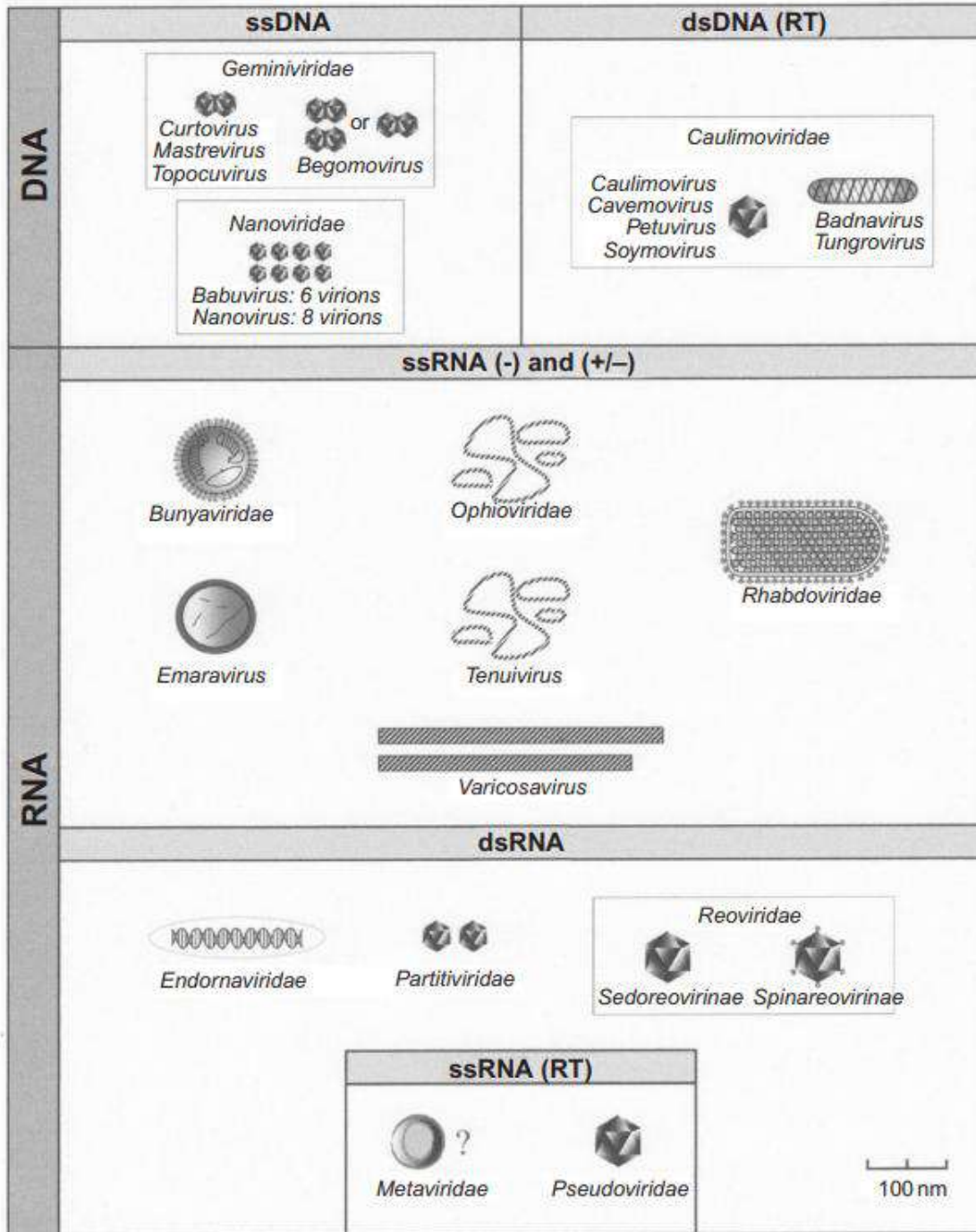
114. Chavanieu A, Pugnère M. Developments in SPR Fragment Screening. *Expert Opin Drug Discov.* 2016;11(5):489-499. doi:10.1517/17460441.2016.1160888/

115. Kitagawa D, Gouda M, Kirii Y. Quick evaluation of kinase inhibitors by surface plasmon resonance using single-site specifically biotinylated kinases. *J Biomol Screen*. 2014;19(3):453-461. doi:10.1177/1087057113506051/
116. Stahelin RV. Surface plasmon resonance: a useful technique for cell biologists to characterize biomolecular interactions. *Mol Biol Cell*. 2013;24(7):883-886. doi:10.1091/mbc.E12-10-0713/
117. Healey GD, Frostell A, Fagge T, Gonzalez D, Conlan RS. A RAGE-Targeted Antibody-Drug Conjugate: Surface Plasmon Resonance as a Platform for Accelerating Effective ADC Design and Development. *Antibodies (Basel)*. 2019;8(1):7. Published 2019 Jan 7. doi:10.3390/antib8010007/
118. Gassner C, Lipsmeier F, Metzger P, et al. Development and validation of a novel SPR-based assay principle for bispecific molecules. *J Pharm Biomed Anal*. 2015;102:144-149. doi:10.1016/j.jpba.2014.09.007/
119. Watare G. W., Gichimu B. M., Arunga E. E. Host plant resistance to bean common mosaic necrosis virus among snap bean cultivars in Kenya //Journal of Plant Protection Research. – 2023.
120. Jordan R., Hammond J. Bean Common Mosaic Virus and Bean Common Mosaic Necrosis Virus (Genus Potyvirus; Potyviridae) //Encyclopedia of Virology,(1). – 2008. – C. 288-295.
121. Drijfhout E. Genetic Interaction between *Phaseolus vulgaris* and Bean Common Mosaic Virus, Doctoral Thesis, Centre Agric. Publ. Docum., 1978. 98 pp., <https://edepot.wur.nl/202002>
122. Morales F.J., Bos L. Bean common mosaic virus. in Adams M.J., Antoniw J.F. (2005). DPVweb: An open access internet resource on plant viruses and virus diseases. *Outlooks on Pest Management* 16, 268-270.<https://www.dpvweb.net/dpv/showdpv/?dpvno=337>
123. Tang, M., Feng, X. Bean Common Mosaic Disease: Etiology, Resistance Resource, and Future Prospects. *Agronomy*, 2023, 13, 58. <https://doi.org/10.3390/agronomy13010058>

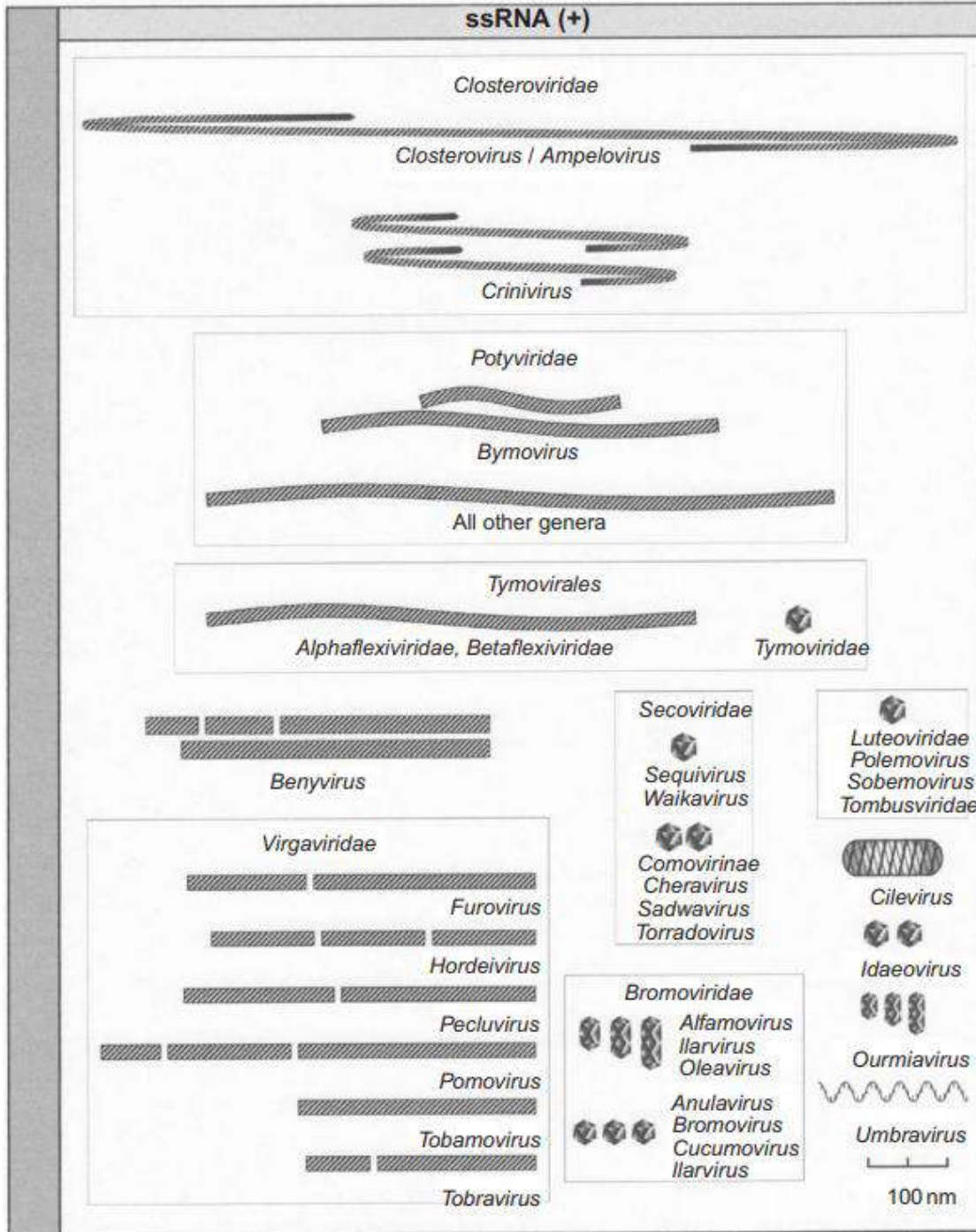
124. Kyrychenko A.N., Kovalenko A.G. Bean Common Mosaic in the Kiev Region: Etiology of Disease and Pathogen Identification/ *Mikrobiol. Z.* 2018; 80(4):96-107. doi: <https://doi.org/10.15407/microbiolj80.04.096>
125. Worrall E.A., Wamonje F.O., Mukeshimana G., Harvey J.J., Carr J.P., Mitter N. Bean common mosaic virus and bean common mosaic necrosis virus: relationships, biology, and prospects for control. *Adv. Virus Res.* 2015; 93:1-46. doi: 10.1016/bs.aivir.2015.04.002
126. Loh H.S., Green B.J., Yusibov V. Using transgenic plants and modified plant viruses for the development of treatments for human diseases// *Curr. Opin. Virol.* -2017. -№26. – P. 81–89. doi: 10.1016/j.coviro.2017.07.019.
127. Rai, R.; Khurana, S.M.P.; Kumar, S.; Gupta, N.; Baranwal, V.K. Serological detection of grapevine leafroll-associated virus 4 in grapevine growing areas of India using polyclonal antiserum raised against the recombinant coat protein. *Crop. Prot.* 2018, 109, 128–135.
128. Rubio L., Galipienso L., Ferriol I. Detection of plant viruses and disease management: Relevance of genetic diversity and evolution. *Front. Plant. Sci.* 2020;11:1092. doi: 10.3389/fpls.2020.01092.
129. Evans D.J. Applications of plant viruses in bionanotechnology. *Curr Top Microbiol.* 2011;375:61–87 doi: 10.1007/82_2011_184.
130. Dijkstra, J., de Jager, C.P. (1998). Dehydration. In: *Practical Plant Virology. Springer Lab Manual.* Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-72030-7_37
131. Yordanova A, Stoimenova E, Donev T. Prediction of the preservation of freeze-dried cucumber mosaic virus // *Biotechnol Lett.* – 2000 – V.22. - P1779–82. <https://doi.org/10.1023/A:1005602320470>
132. Jingwei, Li & Wang, Min Rui & Chen, Hai-Yan & Zhao, Lei & Cui, Zhen-Hua & Hamborg, Zhibo & Blystad, Dag-Ragnar & Wang, Qiao-Chun. Long-term preservation of potato leafroll virus, potato virus S, and potato spindle tuber viroid in

cryopreserved shoot tips // Applied Microbiology and Biotechnology. - 2018. – V.102.
10.1007/s00253-018-9405-7.

Virus taxa infecting plants (part 1)



Virus taxa infecting plants (part 2)





НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ

ФАКУЛЬТЕТ ЗАХИСТУ РОСЛИН, БІОТЕХНОЛОГІЙ
І ЕКОЛОГІЇ

ЗБІРНИК

матеріалів доповідей

**X МІЖНАРОДНОЇ НАУКОВО-ПРАКТИЧНОЇ
КОНФЕРЕНЦІЇ СТУДЕНТІВ, АСПРАНТІВ**

І МОЛОДИХ ВЧЕНИХ



**«ЕКОЛОГІЯ – ФІЛОСОФІЯ ІСНУВАННЯ
ЛЮДСТВА»**

24-25 квітня 2024 р.

Київ – 2024

<i>Бойко А.О., Ракоїд О.О.</i> МЕТОДИЧНІ ПІДХОДИ ДО МОНИТОРИНГУ ПРОЦЕСІВ ДЕГРАДАЦІЇ ТА ОПУСТЕЛЮВАННЯ ЗЕМЕЛЬ НА ГЛОБАЛЬНОМУ ТА НАЦІОНАЛЬНОМУ РІВНЯХ.....	39
<i>Британь С.О., Ладика М.М.</i> АНТРОПОГЕННИЙ ВПЛИВ НА ОЗЕРА ТЕЛЬБІН ТА НИЖНІЙ ТЕЛЬБІН.....	41
<i>Бричка Б.В., Паламарчук С.П.</i> ЕКОЛОГІЧНА ОЦІНКА ТА ЕТАПИ ЇЇ ПРОВЕДЕННЯ.....	43
<i>Булик В.О., Гнатюк Т.Т.</i> ВИЗНАЧЕННЯ ЧУТЛИВОСТІ ФІТОПАТОГЕННИХ МІКООРГАНІЗМІВ ДО МІКРОЕЛЕМЕНТНОГО КОМПЛЕКСНОГО ДОБРИВА.....	45
<i>Буцак А.В., Вагалюк Л.В.</i> ВПЛИВ РОСІЙСЬКОЇ АГРЕСІЇ НА ПРИРОДНО-ЗАПОВІДНІ ТЕРИТОРІЇ ЧЕРНІГІВСЬКОЇ ОБЛАСТІ.....	47
<i>Варик Г.С.</i> СУДОВА ІНЖЕПЕРНО-ЕКОЛОГІЧНА ЕКСПЕРТИЗА ПРИ РОЗСЛІДУВАННІ ВОЄННИХ ЗЛОЧИНІВ.....	48
<i>Вільховий С.П., Лобова О.В.</i> ТЕОРЕТИЧНІ ОСНОВИ ОТРИМАННЯ АСЕПТИЧНИХ РОСЛИН ALOE VITRO.....	50
<i>Вороніць Д.С., Таран О.П.</i> ЗАСТОСУВАННЯ МЕТОДУ ПОВЕРХНЕВОГО ПЛАЗМОННОГО РЕЗОНАНСУ (SPR) ПРИ ДІАГНОСТУВАННІ ВІРУСУ ЗВИЧАЙНОЇ МОЗАЇКИ КВАСОЛІ (VCMV).....	52
<i>Вратських С.В.</i> КУЛЬТИВУВАННЯ КУЛЬТУР СУСПЕНЗІЙНИХ КЛІТИН ТА КАЛЮСНИХ ТКАНИН <i>ATROPA BELLADONNA L.</i>.....	54
<i>Gavryliuk A.T., Kuryk M.M., Rozhok O.M.</i> PREPARATION BIOGRAN (SOLUTION) ON PRODUCTIVITY IN TERMS OF WESTERN UKRAINIAN FORESTSTEPPE PROVINCE.....	55
<i>Галюк І.І., Манішевська Н.М.</i> НЕГАТИВНІ НАСЛІДКИ ЗАБРУДНЕННЯ АТМОСФЕРИ АВТОТРАНСПОРТОМ.....	57
<i>Гапоненко А.М., Салькінова А.В.</i> ВИЗНАЧЕННЯ ПОТЕНЦІАЛУ ЗАСТОСУВАННЯ РОСЛИН РОДИНИ КАПУСТЯНИХ (BRASSICACEAE) ДЛЯ ФІТОРЕМЕДІАЦІЇ СВИНЦЮ У ГРУНТІ.....	59
<i>Гарячий І.В., Кудрявицька А.М.</i> ГАЗОЗАХИСНІ ЕКРАНУВАЛЬНІ ЗЕЛЕНІ СМУГИ І ЕФЕКТИВНІСТЬ ШУМО- ТА ГАЗО ЗАХИСТУ ЕЛЕМЕНТАМИ РЕЛЬСФУ.....	61
<i>Гафко М.Ю., Іванченко Т.І., Сіпак І.В.</i> ЗНАЧЕННЯ ТА ВПЛИВ СІВОЗМІНИ НА СТАЛНИЙ РОЗВИТОК.....	63

УДК 636.09:616.993.192–07:636.2

ЗАСТОСУВАННЯ МЕТОДУ ПОВЕРХНЕВОГО ПЛАЗМОННОГО РЕЗОНАНСУ (SPR) ПРИ ДІАГНОСТУВАННЯ ВІРУСУ ЗВИЧАЙНОЇ МОЗАЇКИ КВАСОЛІ (BCMV)

Воронець Д.С., студент ОС Магістр

Таран О.П., канд. біол. наук

Національний університет біоресурсів і природокористування України

м. Київ

e-mail: dimavoronets01@gmail.com

Дослідження вірусів рослин відкривають значні можливості з'ясування зв'язків між організмами в різноманітних ценозах, що важливо для розуміння і пошуку методів підтримування стабільності природних екосистем, а також штучно створених, таких, як агроценози. Віруси рослин наносять щорічно значні втрати урожаю сільськогосподарських культур. Наприклад, вважається, що наявність 1% інфікованих рослин у насадженнях картоплі призводить до зниження урожайності на 1%, а інфікованість насаджень може сягати десятків відсотків. [1]. Крім того, мінливий кліматичний сценарій і глобальне потепління може призвести до різкого зростання поширення і тяжкості таких захворювань по всьому світу, що зробить боротьбу з ними ще більш складним завданням.

Метою нашої роботи є адаптація методу поверхневого плазмонного резонансу (SPR) для діагностування вірусу звичайної мозаїки квасолі. Вірус звичайної мозаїки квасолі (BCMV) — один із найшкідливіших і найпоширеніших вірусів квасолі. Збудник може передаватися з насінням і пилком з досить високою частотою. При ефективному розповсюдженні векторами сприйнятливих культур навіть низький рівень зараження насіння може призвести до епідемічної ситуації. В Україні BCMV широко розповсюджений у всіх зонах вирощування бобових бобів і може спричинити серйозні втрати врожаю. Тому важливим є виявлення зараженого насіння на ранніх етапах [134].

Розроблений метод може бути використаний як ефективний інструмент для ранньої діагностики та моніторингу BCMV у вирощуванні квасолі, сприяючи збереженню врожаю та екологічній стійкості аграрного сектору. Він може стати важливим внеском у боротьбу з вірусними захворюваннями рослин, покращуючи екологічну стійкість та ефективність сільського господарства. Для подальшого розвитку цього напрямку необхідно провести додаткові дослідження щодо оптимізації методу та його впровадження у практику [135].

Саме тому, наша робота спрямована на розробку та оптимізацію методу SPR для діагностики BCMV у рослинах квасолі. Це включає розробку специфічних біосенсорів та

протоколів обробки зразків. Ми проводимо серію експериментів для визначення чутливості та специфічності нашого методу виявлення ВСМV у рослинах квасолі. Для цього використовуємо прилад “Плазмотест”, розроблений Інститутом кібернетики НАН України. У цьому реалізовано принцип поверхневого плазмонного резонансу [142], та застосовано сучасні підходи візуалізації результатів реакцій між лігандом та аналітом на функціоналізованій поверхні [5]. Для порівняння результатів дослідження було використано метод ІФА з ліофілізованих зразків рослин квасолі із симптомами вірусного інфікування.

При дослідженні іммобілізації антитіл до ВСМV на поверхні біосенсора та зв'язування вірусних часток цим лігандом зміна резонансного кута лежала в межах 0,3-0,4 градуса. Також спостерігали тривале стабільне значення резонансного кута – 62,8-62,9 градуса на етапі утворення імунних комплексів, що свідчить про стабільність зв'язування аналіту – вірусних часток з лігандом – антитілами.

Таким чином, показана можливість іммобілізації на поверхні трансд'юсера ППР-біосенсора антитіл до ВСМV в якості лігандів та виявлення часток вірусу за допомогою імунної реакції між антитілами та капсидними білками. Одержані результати можна використовувати для вдосконалення аналізів діагностики на основі антитіл до вірусів рослин. Використання SPR в біологічних дослідженнях відкриває нові перспективи для точного та чутливого виявлення патогенів у сільському господарстві. Дані дослідження мають важливе значення для забезпечення стійкості вирощування квасолі та збереження екологічної рівноваги у сільському господарстві.

Список використаної літератури

133. Applications of Surface Plasmon Resonance and Biolayer Interferometry for Virus–Ligand Binding / Shruthi Murali ORCID, Richard R. Rustandi, Xiwei Zheng, Anne Payne and Liang Shang *Viruses* 2022, 14(4), 717; <https://doi.org/10.3390/v14040717>
134. Поширення вірусу звичайної мозаїки квасолі з насінням *phaseolus vulgaris* cv червона шапочка / Кириченко, А. М.; Антипов, І. О.; Гринчук, К. В.; Ліханов, А. Ф. doi 10.31548/biologiya2020.01.069
135. Surface plasmon resonance: A versatile technique for biosensor applications. / *Sensors* Nguyen, H.H.; Park, J.; Kang, S.; Kim, M. / 2015, 15, 10481–10510.
136. Homola, J., *Surface Plasmon Resonance Based Sensors*. Springer, 2006.
137. Sun, S., Wang, Y., Xia, Y., *Gold Nanoparticles: From Synthesis and Properties to Biological and Biomedical Applications*. *Advances in Biomedical Engineering*, 2014, 1-16.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І
ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ



ФАКУЛЬТЕТ ЗАХИСТУ РОСЛИН, БІОТЕХНОЛОГІЙ ТА ЕКОЛОГІЇ

**ДОСЯГНЕННЯ І ПЕРСПЕКТИВИ В ЗАХИСТІ ТА КАРАНТИНІ
РОСЛИН**

*Матеріали III Всеукраїнської науково-практичної конференції
здобувачів вищої освіти, присвяченій 126-річчю НУБіП України*

(23 квітня 2024 р.)



Київ-2024

<i>Шкрібтій В.А., Сикало О.О.</i>	
Моніторинг бур'янів у післяжнивних посівах проса звичайного.	
<i>Яковець А.С., Марковська О.Є.</i>	191

IV. СЕКЦІЯ – «БІОЛОГІЧНИЙ ЗАХИСТ, ОХОРОНА ЗДОРОВ'Я»

Морфогенез <i>in vitro</i> різних генотипів коноплі (<i>Cannabis sativa</i> L.).	
<i>Абдувалієва Н., Кляченко О.Л.</i>	194
Дослідження впливу антропогенних забруднювачів на водні екосистеми методом питостатичної реакції культури дафній (<i>Daphnia pulex</i> / Magna).	
<i>Бідушка Д. С., Нестерова Н. Г.</i>	195
Визначення чутливості фітопатогенних мікоорганізмів до мікроелементного комплексного добрива. <i>Буняк В. О., Гуатюк Т. Т., Бородай В. В.</i>	198
<i>Aloe vitro</i> та її використання в різних промислових галузях.	
<i>Вільховий С.П., Лобова О.В.</i>	200
Дослідження антигенів рослинних вірусів методом поверхневого плазмонного резонансу. <i>Воронець Д.С., Тарап О.П.</i>	201
Біосинтез інсектицидних білків в рослинах для боротьби зі шкідниками.	
<i>Герасименко А.С., Прилуцька С.В.</i>	202
Фактори впливу на в'язкість молочно-киселих продуктів за використання <i>Streptococcus thermophilus</i> . <i>Гуцько Т. С., Бородай В. В.</i>	204
Вплив біологічних препаратів на життєдіяльність фітопатогенного гриба <i>Alternaria alternata</i> (fr.) Keiss.	
<i>Діхтяренко О.М., Косовська Н.А., Безноско І.В., Туровнік Ю.А.</i>	206
<i>Volvariella volvacea</i> у біотехнології: потенціал та перспективи використання.	
<i>Заварін М.А., Бойко О.А.</i>	208
Інноваційна криза в сільськогосподарській сфері України.	
<i>Зеленяк Д.О., Бородай В.В.</i>	210
Комплексне оцінювання якості і безпеки харчової продукції.	
<i>Іванова Т.Д., Коломісць Ю.В.</i>	211
Способи стерилізації шпильки для введення в умови <i>in vitro</i> .	
<i>Каченюк О. А., Лобова О. В.</i>	213
Дослідження дії гідролізату дріжджів як біологічного захисту рослин <i>Capsicum annuum</i> . <i>Качура В.Ю., Нестерова Н. Г.</i>	214
Дослідження ефективності та особливостей мікроклонування в умовах <i>in vitro</i> для розведення сортів лохини висококущової <i>Vaccinium corymbosum</i> L.	
<i>Кірей А.А., Коломісць Ю.В.</i>	217
Оптимізація біосинтезу циклічних ліпопептидів бактеріями роду bacillus.	
<i>Козлова С.О., Бородай В. В.</i>	218
Бактеріальні фітопатогени картоплі <i>Solanum tuberosum</i> L.	
<i>Кондратюк Д. О., Кваско О. Ю.</i>	221
Особливості введення в культуру <i>in vitro</i> клематиса манжурського (<i>Clematis manschurica</i> Rupr.). <i>Корнілова О.О., Кляченко О.Л.</i>	222
Особливості стерилізації вихідного матеріалу верби для введення в культуру <i>in vitro</i> . <i>Костючек О.С., Лобова О.В.</i>	225
Правові норми біологічного захисту населення, тварин і рослин.	
<i>Кривонос І. В., Піскунова Л. Е.</i>	226
Оцінка потенційної стійкості до посухи пшениці озимої <i>Triticum aestivum</i> L.	
<i>Леопова Т. Р., Даценко А. В.</i>	228

УДК 636.09:616.993.192–07:636.2
ДОСЛІДЖЕННЯ АНТИГЕНІВ РОСЛИННИХ ВІРУСІВ
МЕТОДОМ ПОВЕРХНЕВОГО ПЛАЗМОННОГО РЕЗОНАНСУ

Воронець Д.С., студент ОС Магістр

Науковий керівник: Таран О.П., канд. біол. наук

*Національний університет біоресурсів і природокористування України
 м. Київ*

e-mail: dimavoronets01@gmail.com

Віруси рослин наносять щорічно значні втрати урожаю сільськогосподарських культур. Наприклад, вважається, що наявність 1% інфікованих рослин у насадженнях картоплі призводить до зниження урожайності на 1%, а інфікованість насаджень може сягати десятків відсотків. Тому вчасна діагностика вірусів рослин надає ефективний шлях для підвищення урожайності культурних рослин та запобіганню втратам товарної продукції[1].

Раніше у виявленні зв'язування з біомолекулами загальним обмеженням була вимога мічення молекул репортрними мітками, але вони можуть змінювати конформацію біомолекули або бути стеричною перешкодою. Поверхневий плазмонний резонанс (SPR) вирішує цю проблему, оскільки це технологія детектування у реальному часі, яка використовує зміну показника заломлення тонкого шару металу для одержання інформації про кінетику взаємодії зв'язування молекул аналіту та ліганду[135]. Раннє вивчення SPR проводилося у вигляді досліджень оптичного збудження поверхневих плазмонів на гладких поверхнях, що дозволило в подальшому розвинути SPR в прийнятний і ефективний метод біосенсорики[140].

Метою нашої роботи є адаптація методу поверхневого плазмонного резонансу (SPR) для діагностування Вірусу звичайної мозаїки квасолі . Вірус звичайної мозаїки квасолі (BSMV) — один із найшкідливіших і найпоширеніших вірусів квасолі. Збудник може передаватися з насінням і пилком з досить високою частотою. При ефективному розповсюдженні векторами сприйнятливих культур навіть низький рівень зараження насіння може призвести до епідемічної ситуації. В Україні BSMV широко розповсюджений у всіх зонах вирощування бобових бобів і може спричинити серйозні втрати врожаю. Тому важливим є виявлення зараженого насіння на ранніх етапах[134].

У дослідженні використовувався імунний біосенсор “Плазмотест” на основі поверхневого плазмонного резонансу (ППР). У одному з досліджень 48 тварин із застосуванням “Плазмотесту” показали, що дослідження за допомогою імунного біосенсора на основі ППР є ефективним. Для порівняння результатів дослідження було використано метод ІФА з ліофілізованих зразків рослин квасолі із симптомами вірусного інфікування[142].

Список використаної літератури:

138. Applications of Surface Plasmon Resonance and Biolayer Interferometry for Virus–Ligand Binding / Shruthi Murali ORCID, Richard R. Rustandi, Xiwei

- Zheng, Anne Payne and Liang Shang * Viruses 2022, 14(4), 717; <https://doi.org/10.3390/v14040717>
139. Nguyen, H.H.; Park, J.; Kang, S.; Kim, M. Surface plasmon resonance: A versatile technique for biosensor applications. *Sensors* 2015, 15, 10481–10510. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed] [Green Version]
140. Homola, J.; Yee, S.S.; Gauglitz, G. Surface plasmon resonance sensors: Review. *Sens. Actuators B Chem.* 1999, 54, 3–15. [Google Scholar] [CrossRef]
141. Поширення вірусу звичайної мозаїки квасолі з насінням *phaseolus vulgaris* cv червона шапочка / Кириченко, А. М.; Антіпов, І. О.; Гринчук, К. В.; Ліханов, А. Ф. doi 10.31548/biologiya2020.01.069
142. Ефективність діагностики токсоплазмозу великої рогатої худоби за допомогою імунного біосенсора / Галат М.В., Шаванова К.Є., Стрільчук М.Б., Шпирка Н.Ф., Стародуб М.Ф. // Біологія тварин. — 2016. — Т. 18, № 4. — С. 35–39. — Бібліогр.