

УДК 606:577.213:632.3:633.63

© 2015

К.В. Гринчук

І.О. Антіпов,

кандидат сільсько-
господарських наукНаціональний
університет
біоресурсів
і природокористування
України

РОЗРОБКА МОЛЕКУЛЯРНО- БІОЛОГІЧНОЇ СИСТЕМИ ДЛЯ ІДЕНТИФІКАЦІЇ РНК-4 УКРАЇНСЬКОГО ІЗОЛЯТУ ВІРУСУ НЕКРОТИЧНОГО ПОЖОВТІННЯ ЖИЛОК БУРЯКУ

Мета. Розробити систему ідентифікації РНК-4 українського ізоляту вірусу некротичного пожовтіння жилок буряку (ВНПЖБ) на основі полімеразної ланцюгової реакції. **Методи.** Молекулярно-біологічні. **Результати.** Проведено біоінформативний аналіз нуклеотидних послідовностей РНК-4 ізолятів ВНПЖБ. Установлено консервативні послідовності гена, що кодує протеїн Р31 ВНПЖБ, та розроблено дизайн праймерів для ідентифікації РНК-4. Оптимізовано ПЛР-систему ідентифікації РНК-4 за температурними показниками відпалу праймерів. **Висновки.** Розроблена система діагностики дає змогу своєчасно ідентифікувати ВНПЖБ для запобігання його розповсюдженню.

Ключові слова: вірус некротичного пожовтіння жилок буряку, протеїн, РНК.

Вірус некротичного пожовтіння жилок буряку спричиняє хворобу ризоманію, яка значно знижує врожайність буряків цукрових, втрати можуть досягати 80%. Найкращим способом контролю є використання стійких до ризоманії гібридів і своєчасна діагностика для запобігання розповсюдженню вірусу [1]. Геном ВНПЖБ — мультипартидний, представлений РНК-1, РНК-2, РНК-3, РНК-4, у деяких ізолятах наявна РНК-5 [7].

РНК-4 завдовжки 1431 нуклеотиді містить протеїн Р31, який є супресором функції заповчуження генів [2]. РНК-4 — не важлива для реплікації вірусу у ВНПЖБ в рослині *Nicotiana benthamiana*, але відіграє важливу роль у формуванні симптомів. За наявності РНК-4 в геномі ВНПЖБ на листках рослин *Tetragonia expansa* формуються яскраві хлоротичні ураження, за відсутності РНК-4 — слабкі некрози [5, 7, 9, 11]. Протеїн Р31 необхідний для передавання ВНПЖБ вектором *Polymyxa betae* [10]. РНК-4 також кодує протеїн Р6.5, функції якого не визначені [6].

Мета досліджень — розробити систему ідентифікації РНК-4 ВНПЖБ на основі полімеразної ланцюгової реакції.

Методика досліджень. Для пошуку нуклеотидних послідовностей РНК-4 та проведення біоінформативного аналізу було використано базу даних NCBI (National Center for Biotechnological Information) [4]. Біоінформативний аналіз геномів здійснювали за допомогою програмного забезпечення «MultAlin» (Multiple sequence alignment) [3]. Дизайн праймерів розробляли з використанням програмного забезпечення «Primer3» [8].

Екстракцію РНК проводили із застосуванням комерційного набору «РИБО-Сорб» (AmpliSens, Росія), реакцію зворотної транскрипції — за допомогою комерційного набору «Реверта-L-100» (AmpliSens, Росія) згідно з рекомендаціями виробника.

Реакційна суміш для проведення полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) об'ємом 15 мкл містила: 1х ПЛР буфер з 1,5 мМ MgCl₂ (AmpliSens, Росія), реакцію зворотної транскрипції — за допомогою комерційного набору «Реверта-L-100» (AmpliSens, Росія), 5 пмоль кожного з олігонуклеотидних праймерів, 10–40 нг кДНК, 0,5 U Taq-полімерази (AmpliSens, Росія). Реакцію ампліфікації здійснювали в ДНК-ампліфікаторі «Терцик» ТП4-ПЦР-01.

Після ампліфікації продукти ПЛР розділяли

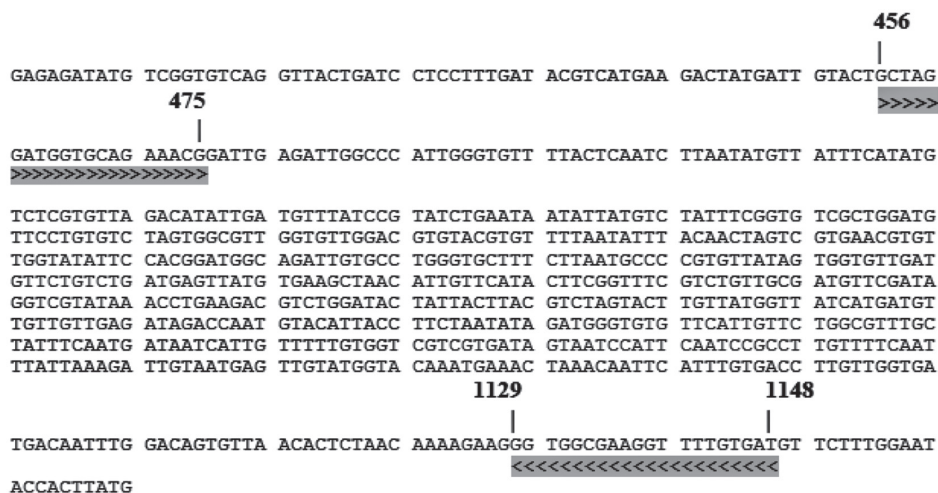


Рис. 1. Локалізація ділянок гібридизації праймерів на ДНК матриці консенсусної послідовності гена P31 ВНПЖБ

методом горизонтального електрофорезу в 1,5%-му агарозному гелі, який готували з використанням TBE буфера з концентрацією 0,5 мг/мл броміду етидію. Результати ПЛР візуалізували в УФ променях транслюмінатора (Т-312-С), фотографували цифровим фотоапаратом «Sony» (DSLR-A500).

Результати досліджень. Для створення дизайну праймерів, специфічних до нуклеотидних послідовностей геному ВНПЖБ,

провели біоінформативний аналіз, першим етапом якого був скринінг консервативних послідовностей гена P31 з використанням даних генетичного банку даних (GenBank). На основі узагальнених даних щодо відомих нуклеотидних послідовностей геномів виявили специфічні консервативні нуклеотидні послідовності гена P31, які в подальшому використали як матриці для олігонуклеотидних затравок у процесі синтезу віруссPECIFICНОГО

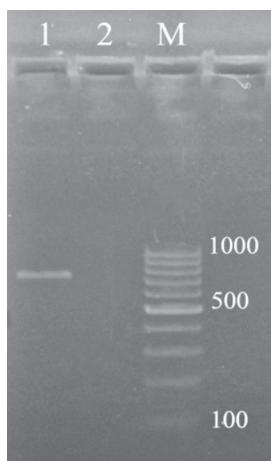


Рис. 2. Електрофореграма продукту ПЛР-аналізу визначення РНК-4 ВНПЖБ: 1 — продукт ампліфікації гена P31; 2 — негативний контроль за проведенням ПЛР-аналізу; M (GeneRuler 10 bp DNA Lader 0241) — маркер довжин фрагментів (пар нуклеотидів)

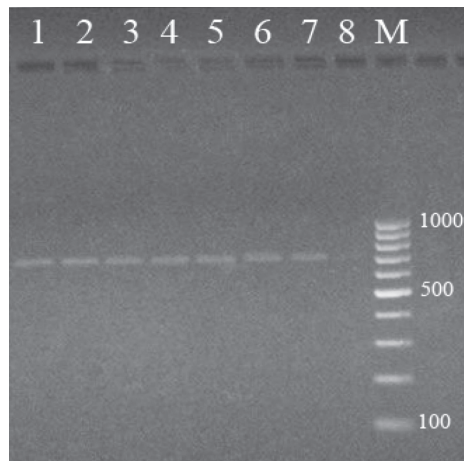


Рис. 3. Електрофореграма оптимізації температури відпалу праймерів для ідентифікації гена P31: 1 — 50°C; 2 — 52°C; 3 — 54°C; 4 — 56°C; 5 — 58°C; 6 — 60°C; 7 — 62°C; 8 — 64°C; M — маркер довжин фрагментів GeneRuler 10 bp DNA Lader 0241 (пар нуклеотидів)

фрагмента (рис. 1). На матриці консенсусної послідовності гена Р31 створено дизайн праймерів з оптимальними характеристиками. Для синтезу було взято праймери з оптимальними показниками GC складу та близькою температурою відпалу обох праймерів: Forward 5'-GCTAGGATGGTGCAGAAACG-3', Reverse 5'-ATCACAAAACCTTCGCCACC-3' з назвами відповідно Р31-F та Р31-R. Розрахункова оптимальна температура відпалу становила для Forward праймеру 58,99°C, Reverse праймеру — 59,04°C, відсотковий уміст дезоксигуанозин-5'-фосфату і дезоксцитидин-5'-фосфату для Forward праймеру становив 55% і Reverse праймеру — 50%.

Полімеразну ланцюгову реакцію здійснювали з використанням кДНК українського ізоляту ВНПЖБ за таких умов: початкова денатурація 5 хв — 94°C; 30 циклів: денатурація 30 с — 94°C, відпал праймерів 30 с — 60°C, елонгація 30 с — 72°C, заключний синтез 72°C — 7 хв. Для контролю за якістю проведення ПЛР-аналізу

використовували негативний контроль.

У результаті візуалізації ПЛР-продуктів ампліфікації виявлено фрагменти розміром 693 пари нуклеотидів. Наявність на електрофореграмі очікуваного продукту реакції свідчить про те, що розроблена система ідентифікації РНК-4 ВНПЖБ є ефективною (рис. 2). На наступному етапі дослідження слід було підібрати робочі температури відпалу праймерів. Проводили серію реакцій із різними температурними режимами відпалу праймерів від 50°C до 64°C. ПЛР проводили за таких умов: початкова денатурація 5 хв — 94°C; 20 циклів: денатурація 30 с — 94°C, відпал праймерів 30 с — 50–64°C, елонгація 30 с — 72°C, завершальний синтез 72°C — 7 хв. Візуально різницю між виходом продуктів реакції ампліфікації в межах температур 50–62°C не спостерігали. За цих умов неспецифічних продуктів ампліфікації не відзначено, а кількість ампліконів була достатньою для чіткої візуалізації в агарозному гелі (рис. 3).

Висновки

Проведено біоінформативний аналіз нуклеотидних послідовностей РНК-4 ізолятів ВНПЖБ. Показано консервативні послідовності гена, що кодує протеїн Р31 ВНПЖБ, та здійснено дизайн праймерів для ідентифікації РНК-4 ВНПЖБ: Forward

5'-GCTAGGATGGTGCAGAAACG-3', Reverse 5'-ATCACAAAACCTTCGCCACC-3'. Рекомендовано проводити ПЛР-аналіз для ідентифікації РНК-4 ВНПЖБ у межах температур 50–62°C відпалу праймерів.

Бібліографія

1. Савчук О. Ризоманія — опасная вирусная болезнь сахарной свеклы [Електр. ресурс]/О. Савчук// Зерно — 2007. — № 1. — Режим доступу до ресурсу: <http://pesticidov.net/ru/articles/pesticidi/4405/>.
2. Identification, subcellular localization and some properties of a cysteine-rich suppressor of gene silencing encoded by peanut clump virus/P. Dunoyer, S. Pfeffer, C. Fritsch et al.//Plant Journal. — 2002. — № 29. — P. 555–567.
3. Multiple sequence alignment by Florence Corpet [Електр. ресурс]. — Режим доступу до ресурсу: <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>.
4. National Center for Biotechnology Information [Електр. ресурс]. — Режим доступу до ресурсу: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>.
5. Pavli O.I. Molecular characterization of beef necrotic yellow vein virus in Greece and transgenic approaches towards enhancing rhizomania disease resistance: dissert. of doctor of agricultural sciences/O.I. Pavli. — Wageningen, 2010. — P. 166.
6. Pferdmenges F. Occurrence, spread and pathogenicity of different Beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) isolates: dissertation zur Erlangung des

Doktorgrades der Fakultät für Agrarwissenschaften/F. Pferdmenges — Göttingen, 2007. — S. 111.

7. Plant Viruses Online. Beet necrotic yellow vein furovirus. [Електр. ресурс]/A. Brunt, K. Grabtree, K. Dalwitz et al. — 1996. — Режим доступу до ресурсу: <http://pvo.bio-mirror.cn/descr086.htm>.

8. Primer3web version 4.0.0 — Pick primers from a DNA sequence. [Електр. ресурс] — Режим доступу до ресурсу: <http://primer3.ut.ee/>.

9. Production and Pathogenicity of Isolates of Beet Necrotic Yellow Vein Virus with Different Numbers of RNA Components/T. Tamada, Y. Shirako, H. Abe et al.//Journal of General Virology. — 1989. — № 70. — P. 3399–3409.

10. RNA4-encoded p31 of beet necrotic yellow vein virus is involved in efficient vector transmission, symptom severity and silencing suppression in roots/M.D. Rahim, I.B. Andika, Ch. Han et al.//Journal of General Virology. — 2007. — № 88. — P. 1611–1619.

11. Virus Taxonomy: the Classification and Nomenclature of Viruses/C.M. Fauquet, M.A. Mayo, J. Maniloff et al. — San Diego, CA. USA: Elsevier Academic Press, 2005. — P. 1162.

Надійшла 12.02.2015.