

МАГІСТЕРСЬКА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

06.07 – МКР. 216 «С». 2023.02.15. 11 ПЗ

СМОЛЯНІНОВА ДМИТРА ІЛІЧА

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І
ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ
Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології

УДК 606:632.3:633

ПОГОДЖЕНО ДОПУСКАЄТЬСЯ ДО ЗАХИСТУ
Декан факультету Завідувач кафедри
захисту рослин, біотехнологій та екології екобіотехнології та
біорізноманіття

Коломієць Ю.В.

Кваско О.Ю.

« »

2023 р.

« »

2023 р.

МАГІСТЕРСЬКА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

Н

спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

Т

Освітня програма «Екологічна біотехнологія та біоенергетика»

Є

Морієнтація освітньої програми освітньо-професійна

У

(освітньо-професійна або освітньо-наукова)

Розробка діагностикумів для експресного виявлення вірусів рослин»

Гарант освітньої програми

д. с.-г. наук, професор

(науковий ступінь та вчене звання)

Лісовий М. М.

(підпис)

(ПІБ)

Керівник магістерської роботи

к. б. наук, старший викладач

(науковий ступінь та вчене звання)

Гаран О. П.

(підпис)

(ПІБ)

Виконав

Смолянінов Д. І.

(підпис)

(ПІБ студента)

КИЇВ-2023

Національний університет біоресурсів
і природокористування України
Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології
ЗАТВЕРДЖУЮ

НАУКОВИЙ СТУПІНЬ, ВЧЕНЕ ЗВАННЯ (науковий ступінь, вчене звання) ПІДПИС (підпис) ІНІЦІАЛИ (ІНІ) 2023 року
ЗАВДАННЯ
ДО ВИКОНАННЯ МАГІСТЕРСЬКОЇ КВАЛІФІКАЦІЙНОЇ РОБОТИ
СТУДЕНТУ

Смолянину Дмитру Іллічу (прізвище, ім'я, по батькові)
Спеціальність 162 «Біотехнологія та біоінженерія» (код і назва)
Освітня програма «Екологічна біотехнологія та біоенергетика» (назва)

Ор (освітньо-професійна або освітньо-наукова)
Тема магістерської кваліфікаційної роботи «Розробка діагностикумів для експресного виявлення вірусів рослин»
затверджена наказом ректора НУБіП України від «15» 02 2023 р. № 216 «С»
Термін подання завершеної роботи на кафедру листопада 2023 р.
(рік, місяць, число)

Вихідні дані до магістерської кваліфікаційної роботи: літературні джерела за темою досліджень, матеріали власних досліджень

Перелік питань, що підлягають дослідженню:
дослідити вміст антигенів PVS у рослинному матеріалі картоплі, інфікованого природним шляхом;
дослідити збереження антигенів у дегідратованому рослинному матеріалі після тривалого зберігання методом ІФА;
вдійснити дослідження антигенів рослинних вірусів за допомогою ППР-

Перелік графічного матеріалу (за потреби)
Дата видачі завдання «01» вересня 2022 р.

Керівник магістерської кваліфікаційної роботи Таран О. П.
(підпис) (прізвище та ініціали)

Завдання прийняв до виконання Смоляннов Д. І.
(підпис) (прізвище та ініціали студента)

НАУКОВИЙ СТУПІНЬ, ВЧЕНЕ ЗВАННЯ ПІДПИС ІНІЦІАЛИ

РЕФЕРАТ

Магістерська кваліфікаційна робота на тему «Розробка діагностикумів для експресного виявлення вірусів рослин» виконана на 61 сторінці друкованого тексту. Містить у собі 16 рисунків, 1 таблицю та 1 додаток.

Опрацьовано 89 літературних джерел.

Робота складається з структурних елементів: зміст, вступ, літературний огляд, огляд об'єкту та методів дослідження, результатів дослідження, висновків, списку використаної літератури та додатків.

Дослідження виконували у лабораторії кафедри екобіотехнології та біорізноманіття НУБіП України.

Метою дослідження стало розробити підходи до створення препаратів позитивних контролів двох рослинних вірусів BCMV та PVS для виконання імуноферментного аналізу при випробуванні рослинного матеріалу на наявність вірусів.

Завдання роботи:

дійснити дослідження передачі вірусу BCMV при штучному інокулюванні рослин квасолі;

ослідити вміст антигенів PVS у рослинному матеріалі картоплі, інфікованого природним шляхом;

ослідити збереження антигенів у дегідратованому рослинному матеріалі після тривалого зберігання методом ІФА;

дійснити дослідження антигенів рослинних вірусів за допомогою ППР-біосенсора в рослинному матеріалі після дегідратації та тривалого зберігання зразків.

Предмет дослідження – збереження антигенних властивостей вірусів BCMV та PVS у дегідратованих рослинних зразках протягом тривалого періоду часу.

Об'єкт дослідження: діагностикуми – позитивні контролі для імуноферментного аналізу рослин на вміст S вірусу картоплі та вірусу звичайної мозаїки квасолі.

Методи дослідження: імуноферментний аналіз, метод поверхневого плазмонного резонансу, статистичні методи.

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

2.4. Тестування зразків рослинного матеріалу методом ППР-аналізу для

НУБІП України

Дослідження методом ІФА зразків рослинного матеріалу після

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

(enzyme-linked immunosorbent assay) – імуноферментний аналіз.

(Direct Antibody Coating Enzyme Linked Immunoassay) – прямий антигензв'язуючий імуноферментний аналіз.

(Double Antibody Sandwich ELISA) - імуноферментний аналіз методом подвійного сендвіча.

CP – (capsid protein) – капсид, протеїнова оболонка вірусу.

– (Cucumber green mottle mosaic virus) - вірус зеленої крапчастої мозаїки огірка.

– (Grapevine fanleaf virus) - вірус листя виноградної лози.

– (Capsicum chlorosis virus) – вірус хлорозу стручкового перцю.

– (Cymbidium mosaic virus) - вірус мозаїки цимбідіуму.

– (Odontoglossum ringspot virus) – вірус кільцевої плямистості одонтоглосуму.

– (quartz crystal microbalance) - кварцові мікроваги.

– (Potato virus S) - вірус картоплі S.

– (Bean common mosaic virus) - вірус звичайної мозаїки квасолі.

– (Groundnut bud necrosis virus) - вірус некрозу бутонів арахісу.

– (Papaya ringspot virus) - вірус кільцевої плямистості папайї.

– (Strawberry crinkle virus) - вірус зморшкуватості полуниці

– (Strawberry mild yellow edge virus) – вірус м'якого жовтого краю полуниці

– (Strawberry mottle virus) - вірус крапчастості полуниці.

– (Strawberry vein banding virus) - вірус жилкування суниці.

– (Apple stem grooving virus) - вірус борозенчатості стебла яблуні.

ВСТУП

Вірус може впливати на якість і врожайність різних фруктових культур, таких як банан, яблуко, виноград і цитрусові, завдаючи величезних економічних збитків [79]. Після зараження рослини зберігають вірус на все життя і демонструють видимі симптоми вірусного захворювання. Запобігти поширенню вірусу та його переносників на нові території через міжнародну торгівлю, головним чином через транскордонний обмін рослинним матеріалом, залишається дуже складно [6].

Актуальність. З вище зазначених причин рання діагностика вірусних захворювань є важливим фактором, що визначає своєчасне застосування захисних заходів для стримування вірусу, тим самим запобігаючи втратам врожаю та зниженню якості плодової продукції.

Крім того, необхідна оптимізація методичних і технічних процедур для випробувальних лабораторій, які здійснюють випробування садивного і насінневого матеріалу культур на віруси. Важливою проблемою у роботі випробувальних лабораторій є відсутність вітчизняних діагностикумів для виявлення вірусів рослин, що значно підвищує собівартість таких робіт за рахунок імпортованих діагностикумів. Розробка підходів для створення вітчизняних діагностикумів для виявлення важливих вірусів сільськогосподарських культур є актуальним питанням, розв'язання якого дозволить активізувати галузь діагностування фітовірусів. Одним із таких підходів є розробка технології одержання позитивних контролів до окремих вірусів сільськогосподарських культур.

Для випробування насінневого матеріалу на вміст вірусів також важливим є використання методів діагностування, що виявляють взаємодії між лігандом-антитілом і аналітом-вірусом в режимі реального часу та за високої специфічності аналізу. Таким методом є застосування імуноаналізу з використанням приладів, які працюють на базі поверхневого плазмонного резонансу – ППР-біосенсів. Особливості цього методу діагностики: безпосереднє виявлення антигенів вірусів в реакції імуноаналізу, що не

потребує зв'язування із міткою, а також кінетична оцінка взаємодії антитіло-капсидний блок вірусу.

Використання у роботі випробувальних лабораторій ППР-біосенсору дозволить підвищити якість процедур перевірки збереження діагностикумів та реагентів, скоротить час на такі процедури та забезпечить ефективний контроль за якістю випробувальних робіт по виявленню вірусів рослин.

Завданням магістерської кваліфікаційної роботи є узагальнення здобутих знань з певної спеціальності, вивчення і дослідження об'єктів з метою їх практичного використання в агропромисловому чи природоохоронному комплексі.

Об'єктом дослідження стали діагностикуми — позитивні контролю для імуноферментного аналізу рослин на вміст S вірусу картоплі та вірусу звичайної мозаїки квасолі

Предметом - факт збереження антигенних властивостей вірусів BCMV та PVS у дегідратованих рослинних зразках протягом тривалого періоду часу.

Для проведення роботи були обрані наступні методи:

1. Метод імуноферментного аналізу, завдяки його ефективності і надійності у виявленні вірусів із сирих екстрактів;
2. Метод поверхневого плазмонного резонансу, завдяки його точності яка досягається реєстрацією змін показників відхилення резонансного кута;
3. Статистичні методи задля якісної обробки отриманих експериментальних даних.

Матеріали за темою магістерської кваліфікаційної роботи були представлені на I турі Всеукраїнського конкурсу студентських наукових робіт з галузей знань і спеціальностей у 2022/2023 навчальному році зі спеціальності «Біотехнології та біоінженерія», де здобули перемогу.

Робота складається з таких структурних елементів: зміст, вступ, літературний огляд, огляд об'єкту та методів дослідження, результатів дослідження, висновків, списку використаної літератури та додатків.

Текст магістерської кваліфікаційної роботи складає 61 сторінку
друкованого тексту, містить 16 рисунків, 1 таблицю і 1 додаток. Опрацьовано
89 літературних джерел.

НУБІП УКРАЇНИ

НУБІП УКРАЇНИ

НУБІП УКРАЇНИ

НУБІП УКРАЇНИ

НУБІП УКРАЇНИ

НУБІП УКРАЇНИ

НУБІП УКРАЇНИ

РОЗДІЛ 1 ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД

1.1 Актуальність досліджень вірусів рослин

Віруси є найбільш генетично різноманітними організмами, які викликають інфекційні захворювання у рослин, тварин і людей. Загалом, віруси складаються з невеликих геномів, що кодують лише кілька білків, що ускладнює контроль над ними різними способами [66]. У рослин з усіх патогенів віруси становлять значний ризик для сільськогосподарського виробництва, викликаючи близько половини всіх інфекцій, що виникають у різних культурних рослин, і спричиняючи близько 40% всіх втрат врожаю через вірусну інфекцію [66]. [46]. Таким чином, віруси знижують як якість, так і кількість продовольчих культур і є одним з основних обмежень для сільськогосподарського виробництва в усьому світі [26]. Відомо, що понад 25 родин вірусів рослин інфікують різні види сільськогосподарських культур у всьому світі, спричиняючи значні економічні збитки [28].

Віруси рослин передаються переважно вертикальним і горизонтальним шляхом. При вертикальній передачі інфікування відбувається шляхом розмноження рослин через батьківські рослини або статевим шляхом через інфіковане насіння. Горизонтальна передача зазвичай відбувається за допомогою комах-переносників, сільськогосподарських знарядь або іншого прямого чи зовнішнього забруднення [23]. При зараженні тим чи іншим видом вірусу інфіковані рослини проявляють різні симптоми, такі як мозаїчні ураження, пожовтіння, хлороз, відставання в рості та некроз, що призводить до втрати належного росту та репродуктивної функції рослин [72].

Наразі існує небагато методів профілактики та лікування вірусних хвороб рослин у польових умовах. Тому раннє виявлення відповідних патогенів є найважливішим кроком у запобіганні поширенню епідемій [1].

Тому для ефективного та результативного лікування хвороб рослин необхідні спеціальні та чутливі методи точного виявлення. У зв'язку з цим постійно розробляються та застосовуються інноваційні технології та методи для

діагностики вірусів. Однак більшість діагностичних методів, що використовуються для виявлення та ідентифікації вірусів, є дорогими, трудомісткими і не підходять для виявлення нових вірусів. Тим не менш, існує потреба в оновленні цих методів діагностики для виявлення нових і різноманітних вірусів та інфекцій, спричинених ними [67]. Найважливішою складністю в діагностиці вірусних захворювань рослин є те, що рослини часто одночасно інфікуються різними видами вірусів або різними варіантами одного виду вірусу [67,36]. З цієї причини одночасне виявлення декількох вірусів є основним вузьким місцем у вірусній діагностиці. Крім того, надзвичайна генетична різноманітність вірусів рослин ускладнює їх точне виявлення за допомогою специфічних методів. Віруси зазвичай складаються з генетичного матеріалу, РНК або ДНК, і мають високу швидкість мутацій [68]. Наразі для швидкого та надійного виявлення вірусних захворювань широко використовуються такі методи та методики, як електронна мікроскопія (ЕМ), імуноферментний аналіз (ІФА), молекулярно-біологічні методи та методи на основі біосенсорів [50]. У більшості випадків для підвищення чутливості та специфічності діагностики захворювань використовують комбінацію декількох методів. Зростає інтерес до оцінки динаміки розвитку вірусів рослин. Однак, як повідомляється, ефективні стратегії для надійного виявлення вірусів в інфікованих рослинах обмежені порівняно з методами для вірусів людини і тварин [48].

1.2 Сучасні методи діагностики рослинних вірусів

Для діагностики вірусів рослин розроблено та впроваджено в практику численні методи. Однак практичне застосування кожного методу в цілому залежить від різних факторів, таких як його вартість, чутливість, швидкість, доступність інструментів та стадія захворювання [49]. Під час вірусної інфекції рослини проявляють різноманітні фізіологічні симптоми. Традиційно для діагностики вірусних хвороб використовують такі візуальні обмеження за допомогою рослин-індикаторів. Крім того, було розроблено кілька методів,

заснованих на кількісній візуалізації з високою роздільною здатністю. З розвитком молекулярно-біологічних методів, серологічних методів та методів на основі нуклеїнових кислот, нові і нові методи стають важливими інструментами для діагностики хвороб рослин.

Першим методом виявлення вірусної інфекції було визначення за симптомами, викликаними вірусом. Цей метод базувався на тестах біологічних індикаторів і був трудомістким та ненадійним, особливо коли вірусна інфекція була латентною або рослина проявляла вірусоподібні симптоми, не пов'язані з етіологією вірусу [6, 65].

Згодом, наприкінці 1930-х років почали використовувати метод виявлення вірусів на мікроскопічному рівні за допомогою електронної мікроскопії, але цей метод не міг бути застосований для широкомасштабного виявлення через розмір і вартість обладнання та умови експлуатації.

Згодом виникли серологічні аналізи, такі як імуноферментний аналіз (ІФА) [12] та аналізи на основі нуклеїнових кислот, що підсилюють ДНК *in vitro*, так звана полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) [10], та досягли значного прогресу в діагностиці вірусів рослин.

З розвитком молекулярної біології методи на основі нуклеїнових кислот значно еволюціонували від звичайної ПЛР до ПЛР_озі зворотною транскрипцією (ЗТ-ПЛР), гніздової ПЛР, мультиплексної ПЛР, ПЛР в реальному часі, ПЛР з імунофіксацією (ІС-ПЛР), петлевої ізотермічної ампліфікації (LAMP), рекомбінантна полімеразна ампліфікація (RPA), ампліфікація з рухомим колом (RCA), а також еволюціонують до мікрочипів та секвенування наступного покоління (NGS), які покращують специфічність, чутливість та обробку декількох зразків [6].

Метод візуального дослідження

Традиційно найпоширенішим методом виявлення патогенів рослин був візуальний огляд заражених рослин і насіння; на початку 20-го століття симптоми вірусних хвороб рослин були запропоновані як основа для таксономії вірусів. Характеристики вірусних хвороб рослин відомої етіології

зазвичай залежать від симптомів, виражених у рослини-господаря. Це пояснюється тим, що симптоми легше ідентифікувати, особливо якщо вони є специфічними для хвороби [56].

Зовнішні симптоми вірусної інфекції рослин тісно пов'язані з певними порушеннями фізіології рослин, які можна розділити на мозаїчну хворобу і хлороз (Рис 1.1).



Рис 1.1 Мозаїка огірня та хлороз перцю [29]

Мозаїчна хвороба змінює колір і форму листя, тоді як хлороз спричиняє системне ураження всієї рослини. У деяких випадках спостерігаються некротичні ураження, які також використовуються для таксономічної ідентифікації вірусів - наприклад, некротичної мозаїки та вірусу смугастості картоплі [8].

Симптоми вірусних хвороб включають зморшкуватість, побуріння тканини листка, мозаїку та некроз.

1.3.1 Переваги методу візуального дослідження

Метод в цілому дозволяє експресно налагодити оцінку стану рослин та визначити певні, найбільш ймовірні, вірусні захворювання рослини.

1.3.2 Недоліки методу візуального дослідження

Візуальні симптоми вірусних захворювань можуть приймати різні форми. Вид (сорт) хазяїна-господаря та стійкість до вірусу можуть визначити первинний

діагноз хвороби і ступінь ураження рослин [82]. На жаль, діагностувати вірусні хвороби за допомогою симптомів складніше, ніж інші патогени, оскільки в рослині можуть бути присутніми кілька вірусів, які можуть змінювати прояв симптомів.

1.4 Імуноферментний аналіз

Вірусна діагностика базується на виявленні вірусних антигенів (переважно компонентів вірусної частинки, таких як субодиниці білка оболонки (CP)) за допомогою антитіл, мічених ферментом. Кількість присутнього вірусу пропорційна кількості мічених ферментом антитіл і виявляється за допомогою колориметричної реакції з субстратом ферменту

ІМУНОФЕРМЕНТНИЙ АНАЛІЗ

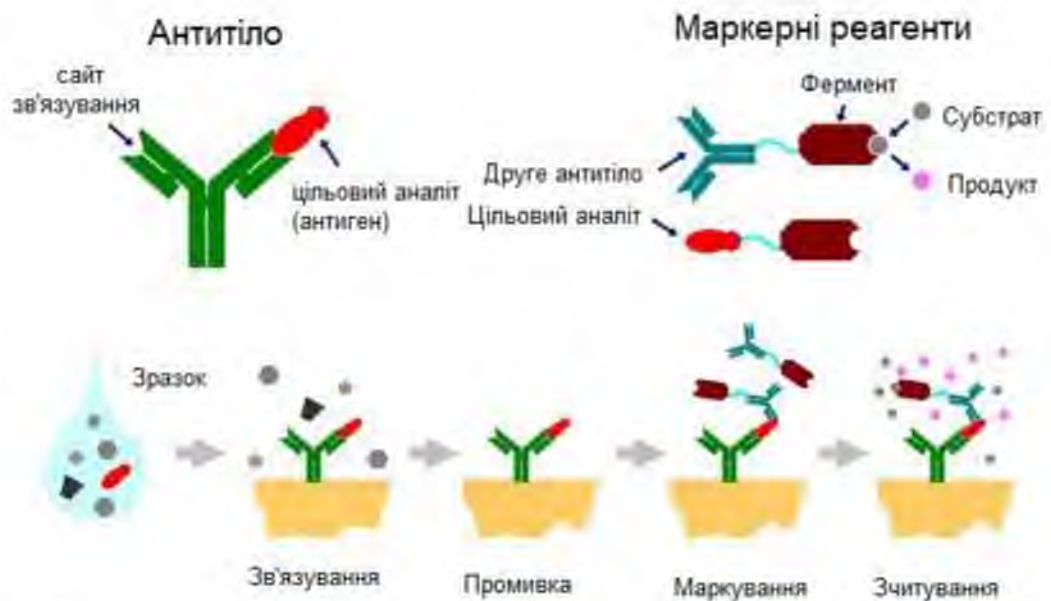


Рис 1.2 Схеми ІФА

Прямий та непрямий ІФА є найбільш поширеними методами діагностики вірусів рослин [13]. Порівняно з прямим антигензв'язуючим ІФА (DAS-ELISA), сандвіч-ІФА з подвійними антитілами (DAS-ELISA) є найбільш використовуваним методом тестування, оскільки він є більш специфічним для вірусу

Важливо, що ці методи здатні виявити навіть близькоспоріднені штами одного вірусу. Однак існує потреба у відповідних концентраціях для виявлення вірусів, де реакції мічених ферментом антитіл функціонують як концентрація вірусу, що робить методику більш придатною для кількісного виявлення вірусного навантаження в зразках [7].

В наш час діагностичні набори на основі DAS-ELISA використовуються в акредитованих лабораторіях для рутинної вірусної індексації та програм сертифікації для більшості садівничих культур [7]. подальшим удосконаленням ELISA є використання моноклональних антитіл (MAbs), які специфічно виявляють певні віруси [7].

1.4.1 Переваги методів ІФА

ІФА (ELISA) є економічно ефективним і надійним аналізом для рутинного виявлення вірусів рослин, особливо тих, що присутні в сирих екстрактах, завдяки своїй простоті, межі виявлення 1-10 нг/мл, здатності аналізувати велику кількість зразків, легкій інтерпретації та напівкількісним результатам [17, 16].

1.4.2 Недоліки методів ІФА

Основним обмеженням ІФА є якість і кількість антитіл. Наприклад, змішані інфекції часто зустрічаються на винограді та цитрусових культурах не можуть бути вироблені для виявлення певного вірусу [80]. З іншого боку, рекомбінантні білки є альтернативним підходом для виробництва імуногенів, особливо проти низьких концентрацій вірусів. Рекомбінантні підходи є швидкими та економічними і долають проблеми, пов'язані з традиційним очищенням антигенів [21]. Крім того, експресійні плазмиди можна зберігати протягом тривалого часу, а рекомбінантні вірусні білки є гомогенними, що робить їх менш імовірними для розпізнавання неспецифічними антитілами. Ці рекомбінантні білки були успішно використані для виробництва поліклональних антитіл (PAbs) проти вірусів, що інфікують папайю, банан і

виноград, а також для розробки імунодіагностики для рутинного тестування коктейлів ПАЛ проти рекомбінантних злиттів двох і трьох вірусів, що інфікують овочеві культури [37]: EMV і вірусу кільцевої плямистості папайї коктейлі PAb були розроблені для *Cucurbitaceae*, *Solanaceae* та інших хазяїв для DAC-ELISA для одночасного виявлення вірусу некрозу бруньок (GBNV;

1.5 Аналізи на основі нуклеїнових кислот. ПЛР

Методи на основі нуклеїнових кислот широко використовуються в багатьох сферах діагностики, включаючи клінічну діагностику, аналіз безпеки харчових продуктів і аналіз навколишнього середовища. Зі стрімким розвитком молекулярно-біологічних методів і методів геномного аналізу їх застосування розширюється і в діагностиці інфекційних патогенів.

Загалом, аналізи на основі нуклеїнових кислот складаються з трьох основних етапів: виділення нуклеїнових кислот (ДНК або РНК), ампліфікація та аналіз продукту. Останній етап є найбільш важливим, оскільки він дає прямі результати [87].

Перебіг процесу ампліфікації в методі ПЛР:

Як правило, під час ПЛР виконується 20-35 циклів, кожен з яких складається з 3 етапів (Рис. 1.3).

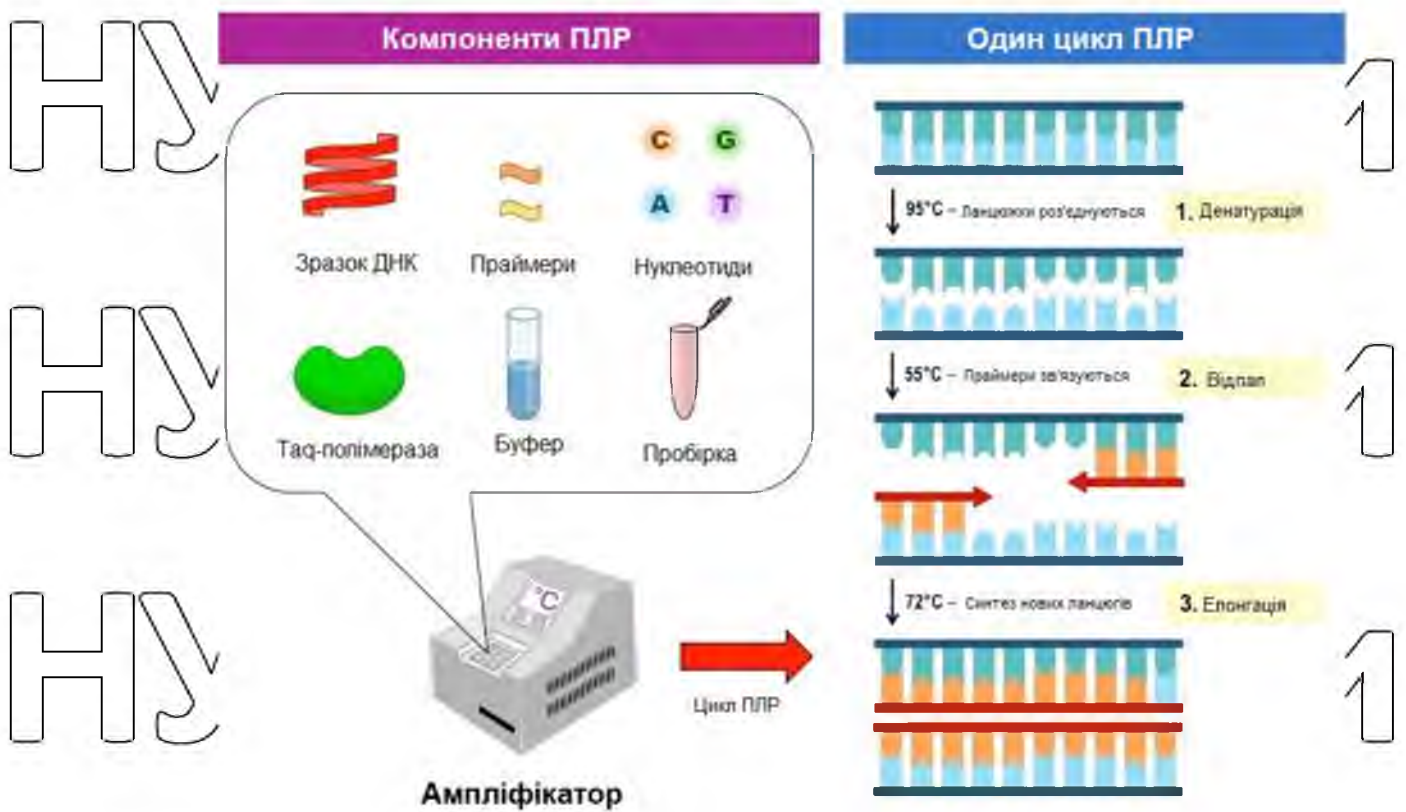


Рис 1.3 Схема ампліфікації при проведенні ПЛР

Дволанцюгову матрицю ДНК нагрівають до 94-96°C (або 98°C, якщо використовується спеціальна термостабільна полімераза) протягом 0,5-10 хвилин для розділення ниток ДНК. Цей етап називається денатурацією, коли розривається водневий зв'язок між двома ланцюгами.

Коли нитки розходяться, температура падає до 50-60°C, і праймер може зв'язуватися з одоланцюговою матрицею. Цей етап називається відпалом. Температура відпалу залежить від послідовності праймерів і зазвичай вибирається на 4—5°C нижче за їх температуру плавлення. Тривалість стадії

0,5—2 хв.

ДНК-полімераза реплікує нитку матриці, використовуючи праймер як заправку. Це так звана стадія елонгації. Максимальне подовження залежить від полімерази. Полімерази Taq і Pfu, що найчастіше використовуються, найактивніші за 72 °C. Тривалість етапу залежить як від типу ДНК-полімерази, так і від довжини ампліфікованого фрагмента. Середня швидкість подовження становить 1000 пар основ за хвилину. Після завершення всіх циклів

використовується додатковий заключний етап нарощування для завершення всіх одониткових фрагментів. Цей етап триває 5-15 хвилин.

Для діагностики на основі нуклеїнових кислот були розроблені різні методи, більшість з яких є трудомісткими і вимагають складного обладнання.

1.5.1 Переваги методів ПЛР

Діагностика на основі ПЛР може бути використана для виявлення вірусів як з ДНК-, так і з РНК-геномами; у випадку РНК-вірусів РНК спочатку зворотно транскрибується в комплементарну ДНК (кДНК) в процесі, відомому як зворотна транскрипція (ЗТ), після чого проводиться звичайна ПЛР, що включає ампліфікацію цільових послідовностей нуклеїнових кислот за допомогою праймерів [55]. Праймери можна легко створити, використовуючи інформацію про вірусну послідовність з баз даних.

Ще одним ключовим елементом успішної ПЛР є виділення високоякісної ДНК, вільної від ендогенних поліфенолів, полісахаридів і нуклеаз. Деякі культури, такі як банан, містять дуже високий рівень поліфенолів та інших вторинних метаболітів, які заважають ампліфікації ПЛР. Тому дуже важливим є підходящий та ефективний метод для виділення нуклеїнових кислот [6].

1.5.2 Недоліки групи методів ПЛР

Звичайна ПЛР зазвичай вважається найважливішим інструментом для діагностики вірусів рослин, однак через проблеми, пов'язані з оптимізацією умов і часом, необхідним для виявлення, ці методи залишаються менш популярними в діагностиці вірусів рослин [3]. Крім того, звичайна ПЛР базується на чистій ДНК, що ускладнює її пряме застосування у вірусології рослин, оскільки більшість рослинних вірусів мають геном на основі РНК.

1.6 Мультиплексна полімеразна ланцюгова реакція

Мультиплексна полімеразна ланцюгова реакція (мультиплексна ПЛР) означає використання полімеразної ланцюгової реакції для одночасної ампліфікації кількох різних послідовностей ДНК (так ніби виконується багато

окремих реакцій ПЛР разом в одній реакції). Цей процес ампліфікує ДНК у зразках за допомогою кількох праймерів і температурно-спосередкованої ДНК-полімерази в термоциклері (Рис 1.4).

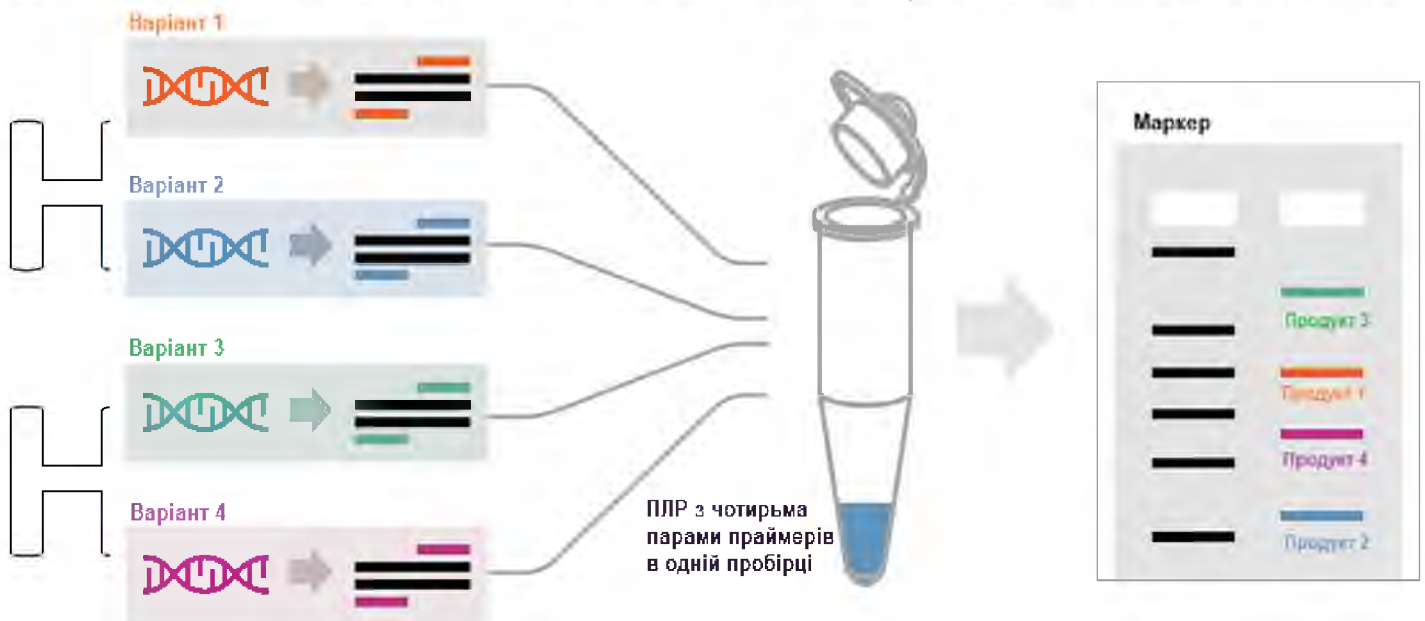


Рис 1.4 Схематичне зображення мультиплексної ПЛР [30]

Конструкцію праймерів для всіх пар необхідно оптимізувати, щоб усі пари праймерів могли працювати при однаковій температурі відгалу під час ПЛР.

Мультиплексна ПЛР була вперше описана в 1988 році як метод виявлення делецій в гені дистрофіну. Його також використовували з геном стероїдної сульфатази.[6] У 2008 році мультиплексну ПЛР використовували для аналізу мікросателітів і SNP.[65] У 2020 році були розроблені мультиплексні аналізи RT-PCR, які поєднували кілька генів-мішеней з Центру захворювань і контролю в одній реакції, щоб підвищити доступність молекулярного тестування та продуктивність для діагностики SARS-CoV-2.

Мультиплексна ПЛР складається з кількох наборів праймерів в одній суміші ПЛР для отримання ампліконів різного розміру, специфічних для різних послідовностей ДНК. Завдяки націлюванню на кілька послідовностей одночасно можна отримати додаткову інформацію з одного тесту, для

виконання якого в іншому випадку знадобилося б кілька разів більше реагентів і більше часу. Температури відпалу для кожного з наборів праймерів повинні бути оптимізовані для правильної роботи в рамках однієї реакції, а розміри ампліконів, тобто їх довжина пари основ, повинні бути достатньо різними, щоб утворювати чіткі смуги при візуалізації за допомогою гель-електрофорезу.

Альтернативно, якщо розміри ампліконів перекриваються, різні амплікони можна диференціювати та візуалізувати за допомогою праймерів, які були пофарбовані флуоресцентними барвниками різного кольору. Комерційні мультиплексні набори для ПЛР доступні та використовуються багатьма

судово-медичними лабораторіями для ампліфікації пошкоджених зразків ДНК.

Мультиплексна ПЛР - це метод, який одночасно і чутливо виявляє різні фрагменти ДНК в одній реакції ПЛР [11], заощаджуючи реагенти і час.

Для виявлення патогенів мультиплексну ПЛР можна проводити різними методами [58]. Мультиплексна ПЛР може бути використана для виявлення вірусів, що переносяться попелиць, які інфікують полуницю, таких як вірус карликовості полуниці (SCV; *Cytorhabdovirus*, *Rhabdoviridae*), вірус м'якої жовтизни полуниці (SMYEV; *Potexvirus*, *Alphaflexiviridae*), вірус крапчастості полуниці (SMoV; невизначений рід) *Secoviridae*), вірус марної смугастості полуниці (SVBV; *Caulimovirus*, *Caulimoviridae*) [78]. Крім того, цей метод був використаний для одночасного виявлення декількох вірусів родини *ASGV*, що інфікують цитрусові [35]. Іншим прикладом одночасного виявлення за допомогою мультиплексної ПЛР є виявлення вірусів винограду, яблук, бананів і гранатів [52, 71, 40, 24], а також комбінацій декількох вірусів і бактерій, що викликають позеленіння цитрусових плодів [51].

1.6.1 Переваги МПЛР

Мультиплексна ПЛР зі зворотною транскрипцією може одночасно виявляти різні РНК-мішені. Після зворотної транскрипції цільової РНК мультиплексна ПЛР використовується для одночасної ампліфікації кДНК з використанням специфічних наборів праймерів в одній пробірці. Для

кількісної оцінки вірусного навантаження ця методика може виконуватися в режимі реального часу, відома як мультиплексна ПЛР зі зворотною транскрипцією в реальному часі. Мультиплексна ПЛР в реальному часі використовує набір видоспецифічних праймерів і зондів, мічених різними флуоресцентними барвниками для кожного виду-мішені, так що приблизно від двох до п'яти видів (в залежності від умов експерименту) можуть бути виявлені одночасно в одній реакції ПЛР в реальному часі. У порівнянні з одиночною ПЛР в реальному часі, мультиплексна ПЛР в реальному часі скорочує час обробки і кількість використовуваних реагентів

1.6.2 Недоліки МПЛР

Мультиплексування вимагає розробки праймерів, які не є самокомплементарними і мають дуже схожі температури відпалу, продукти ПЛР розрізняють за розміром і флуоресцентним маркуванням [58, 35].

Одним з основних обмежень методів мультиплексування є те, що оптимізація температури відпалу декількох наборів праймерів займає багато часу, що знижує чутливість детектування. Крім того, різні мішені можуть конкурувати між собою в реакції, і дуже мала кількість мішеней може заважати великій кількості мішеней.

ПЛР у реальному часі

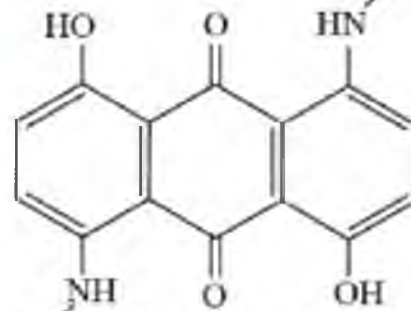
Головна вирізняюча ознака цього методу це те що відстежування ампліфікації цільових молекул ДНК під відбувається час ПЛР (тобто в режимі реального часу), а не в кінці, як у звичайній ПЛР. ПЛР в режимі реального часу можна використовувати кількісно або напівкількісно (вище/нижче певної кількості молекул ДНК).

Двома поширеними методами виявлення продуктів ПЛР в режимі реального часу є неспецифічні флуоресцентні барвники, які інтеркалюють з будь-якою дволанцюговою ДНК (Рис. 1.5), і специфічні для послідовності ДНК зонди, що складаються з олігонуклеотидів, мічених флуоресцентним репортером, з зондом і його комплементарною послідовністю.

НУБ



Інтеркалюючий барвник



DRAQ5

НИ

НУБ

НИ

НУБіп України

Рис. 1.5 Інтеркалюючий барвник DRAQ5

Виявляється тільки після гібридизації зонда з його комплементарною послідовністю.

Мінімальні інформаційні рекомендації для публікації експериментів з кількісної ПЛР у реальному часі (MIQE) рекомендують скорочувати кількісну ПЛР у реальному часі як qPCR, а зворотну транскрипцію-qPCR як RT-qPCR. Зазвичай використовується абревіатура "RT-qPCR", зворотна транскрипція-полімеразна ланцюгова реакція, а не ПЛР у реальному часі, але не всі автори дотримуються цієї конвенції.

НУБіп України

ПЛР у реальному часі виключає використання електрофорезу в агарозному гелі та дозволяє визначати збільшення кількості ампліфікованої ДНК через флуоресцентний сигнал [45, 44]. Це вимагає використання

НУБіп України

неспецифічних флуоресцентних барвників (наприклад, SYBR green, LUX тощо) або спеціальних зондів, позначених флуоресцентними барвниками

НУБіп України

(наприклад, TaqMan, Molecular beacon тощо). Зелений барвник SYBR неспецифічно зв'язується з молекулами дДНК; отже, генерована флуоресценція може бути викликана специфічними або неспецифічними

НУБіп України

ампліконами або димерами праймерів. У таких випадках профілі плавлення використовуються, щоб відрізнити димери праймерів від фактичної ампліфікації [7].

З іншого боку, зонди, мічені флуоресценцією, є специфічними, оскільки для генерації сигналу з мішенню повинні зв'язуватися більше двох незалежних олігонуклеотидів.

1.7.1 Переваги методу

На відміну від розробки антитіл, необхідних для серологічних тестів, ПЛР у реальному часі успішно використовується для специфічного та чутливого виявлення вірусів [7]. Незважаючи на те, що ПЛР у реальному часі потребує дуже дорогого обладнання, загальна вартість розробки антитіл набагато вища. Мультиплексна ПЛР зі зворотною транскрипцією в режимі реального часу дозволяє виявити різні цільові РНК шляхом одночасної ампліфікації кДНК, утворених шляхом зворотної транскрипції, з набором специфічних праймерів в одній пробірці за допомогою мультиплексної ПЛР, що дає кількісні результати [53].

З іншого боку, вкладена ПЛР зі зворотною транскрипцією в реальному часі є простим і чутливим методом виявлення патогенних мікроорганізмів. Ця методика передбачає попередній етап зворотної транскрипції для синтезу кДНК і використання двох зовнішніх і двох внутрішніх праймерів, які є комплементарними до цільової послідовності, що підвищує чутливість, забезпечуючи кількісні результати [53]. Підсумовуючи, головними перевагами ПЛР-аналізу в реальному часі є специфічність і швидкість, висока продуктивність тестування, виявлення низького титру вірусу та менший ризик зараження.

1.7.2 Недоліки методу

Одним із обмежень ПЛР та RT-PCR для виявлення вірусів є те, що продукти ПЛР вимагають фарбування агарозного гелю флуоресцентними барвниками, такими як бромід етидію, SYBR Green, SYBR Gold, SYBR Safe, Eva Green, GelRed, EZ-Vision тощо [25], що не зручно для додатків з високою пропускнуою здатністю. Крім того, кількість продукту ПЛР не пропорційна

кількості цільової ДНК, і забруднення через відкриття пробірок може призвести до хибно позитивних результатів.

1.8 Методи біосенсорів

Біосенсори - це портативні діагностичні пристрої, засновані на взаємодії антиген-антитіло (імуносенсори) або гібридизації нуклеїнових кислот у поєднанні з фізико-хімічними перетворювачами-мікросистемами [61].

Біосенсор складається з рецептора, перетворювача і процесора, і ця технологія робить його економічним і чутливим для негайного виявлення вірусів в екстрактах листя (Рис 1.6).



Рис 1.6 Флуорометр "Флоратест", здійснює вимір параметрів індукції флуоресценції хлорофілу

Залежно від параметрів вимірювання, датчики можуть бути оптичними (реєструють зміни світлопропускання), тепловими (вимірюють зміни температури), потенціометричними (вимірюють потенціал при постійному струмі), амперометричними (вимірюють струм при постійному потенціалі), циклічними вольтамперометричними (вимірюють струм при постійному струмі), змінному потенціалі, магнітними або п'єзоелектричними (вимірюють

зміни маси) мікросистеми. Ці датчики перетворюють біологічні сигнали в електричні, інтенсивність яких прямо пропорційна концентрації певного аналіту [75]. Наночастинки золота (НЧЗ) використовують для іммобілізації різних біомолекул завдяки їхній великій площі поверхні, високій біосумісності та високому потенціалу перенесення електронів.

Біосенсор на основі аналізу біоелектричного розпізнавання (BERA) — це інтелектуальна система для виявлення вірусів рослин, що поєднує в собі принцип штучних нейронних мереж і біосенсорів. Наприклад, біосенсори BERA виявляють електричну відповідь, спричинену взаємодією клітинної культури, суспендованої в гелевій матриці, з CGMMV [22]. Ця відповідь була створена опосередковано, враховуючи сигнал, створений розпізнаванням антитілами CGMMV CP.

Біосенсор на основі магнітного імуноаналізу був розроблений для виявлення та кількісного визначення GFLV, що було досягнуто за допомогою імунофільтраційного підходу з подвійними антитілами [64]. Крім того, був розроблений амперометричний біосенсор для діагностики вірусу хлорозу стручкового перцю (CaCV; Orthotospovirus, Tospoviridae), який показав ~1000 разів більшу чутливість, ніж DAC-ELISA [73]. Зразок антигену поміщали на поверхню GNP/багатостінних вуглецевих нанотрубок, надрукованих трафаретним друком, для взаємодії з поліклональними антитілами, специфічними для CaCV та GBNV.

Кварцові мікروагаи (QCM) — це чутливий прилад для вимірювання маси, що складається з кристалічної пластини кварцу, розміщеної між двома металевими електродами, підключеними до контуру зовнішнього генератора, який записує резонансну частоту [69]. П'єзоелектричні імуносенсори на основі штучних або природних антитіл і QCM здатні виявляти BTM та вірус хлоротичної плямистості кукурудзи (MCMV; *Machlomovirus*, *Tombusviridae*), і вони можуть бути корисними для виявлення вірусів, що інфікують плоді рослини [27, 33].

Оптичний мініатюрний датчик ДНК на папері ідентифікував ранню інфекцію, спричинену ВВТV. Деякі ДНК-біосенсори засновані на гібридизації нуклеїнових кислот і QCM-детектуванні молекул ДНК [39, 38]. У зв'язку з цим біосенсори QCM на основі нуклеїнової кислоти, розроблені для виявлення інфекцій вірусу мозаїки цимбідіуму (*CymMV; Potexvirus, Alphaflexiviridae*) та вірусу кільцевої плямистості одонтоглосума (*ORSV; Tobamovirus, Virgaviridae*) в орхідей, є більш чутливими, ніж ті, що базуються на розпізнаванні антигін біосенсори ДНК QCM мають іммобілізовані послідовності нуклеїнових кислот, які більш ефективно зв'язуються з комплементарними послідовностями генів CP вірусу [18]. Потенціометричний біосенсор використовувався для виявлення послідовностей ДНК з РРV в рослинних екстрактах [47]. Крім того, циклічний вольтаметричний біосенсор зміг відрізнити фітоплазму білого листа цукрової тростини та вірус мозаїки цукрової тростини (*SCMV; Potyvirus, Potyviridae*) [84].

1.8.1 Переваги методу біосенсорів

Перевагами біосенсорів є висока селективність і чутливість (особливо в випадках антиген-антитіло) можливість мініатюризації та сумісність з комп'ютерними процесами, також вони характеризуються невисокою вартістю та малими габаритними розмірами, стабільністю сигналу, зручністю в експлуатації.

1.8.2 Недоліки методу біосенсорів

До недоліків біосенсорів варто віднести чутливість до коливань температури і значень рН, а також обмеження при роботі з біологічними матеріалами пов'язані з їх обмеженою стабільністю.

1.9 Біосенсор на основі поверхневого плазмонного резонансу

це метод, заснований на фотоелектронному явищі, яке виникає при падінні видимого або ближнього інфрачервоного світла на металеві поверхні, такі як Ag, Au, Cu та Al. Випромінювання проходить через спеціальну призму і

колімується на детекторі (фотодіодній матриці) з певним показником заломлення (RI) [9]. Зі зміною кута падіння змінюється вихідне світло, доки не буде досягнуто критичного кута. Це явище відоме як повне внутрішнє відбиття (ПВВ).

Якщо частота падаючого світла дорівнює резонансній частоті металу, енергія передається від світлового фотона до поверхневих електронів металу. В результаті електрони рухаються і генерують електричні хвилі (на глибині 200 нм), які називаються плазмонами [54].

Явище поверхневого плазмонного резонансу виникає при певній частоті світла/куті падіння, залежить від RI біля поверхні металу і змінюється з масою поверхні чіпа. Коли молекули зв'язуються в електричному полі, маса поверхні чіпа змінюється, збурюючи плазмон і змінюючи резонансну довжину хвилі.

Найпоширеніший метод виявлення SPR базується на конфігурації ослабленого повного відбиття Кречмана-Лесера (ATR). Згідно з конфігурацією Кречмана, зміни діелектричної проникності середовища поблизу поверхні металевієї плівки виявляються шляхом вимірювання змін інтенсивності відбитого променя.

Змінюючи геометричну конфігурацію, довжину оптичної хвилі і поверхню сенсора, було розроблено кілька гібридних методів SPR, включаючи електрохімічний поверхневий плазмонний резонанс (EC-SPR), локалізований поверхневий плазмонний резонанс (LSPR) і SPR-візуалізацію (SPRi). У EC-

SPR тонка металева плівка розміщується на підкладці, яка розміщена на підкладці для стимуляції поверхневих плазмонів. Це діє як електрод для електрохімічного детектування, надаючи інформацію про електрохімічні та оптичні властивості плівки [41, 4, 5, 59]. Електрохімічна конфігурація в поєднанні з SPR може бути використана для вивчення кінетичних реакцій біомолекул в присутності електричного поля.

Поверхневий плазмонний резонанс — ATR через конфігурацію Кречмана (Рис 1. 7).

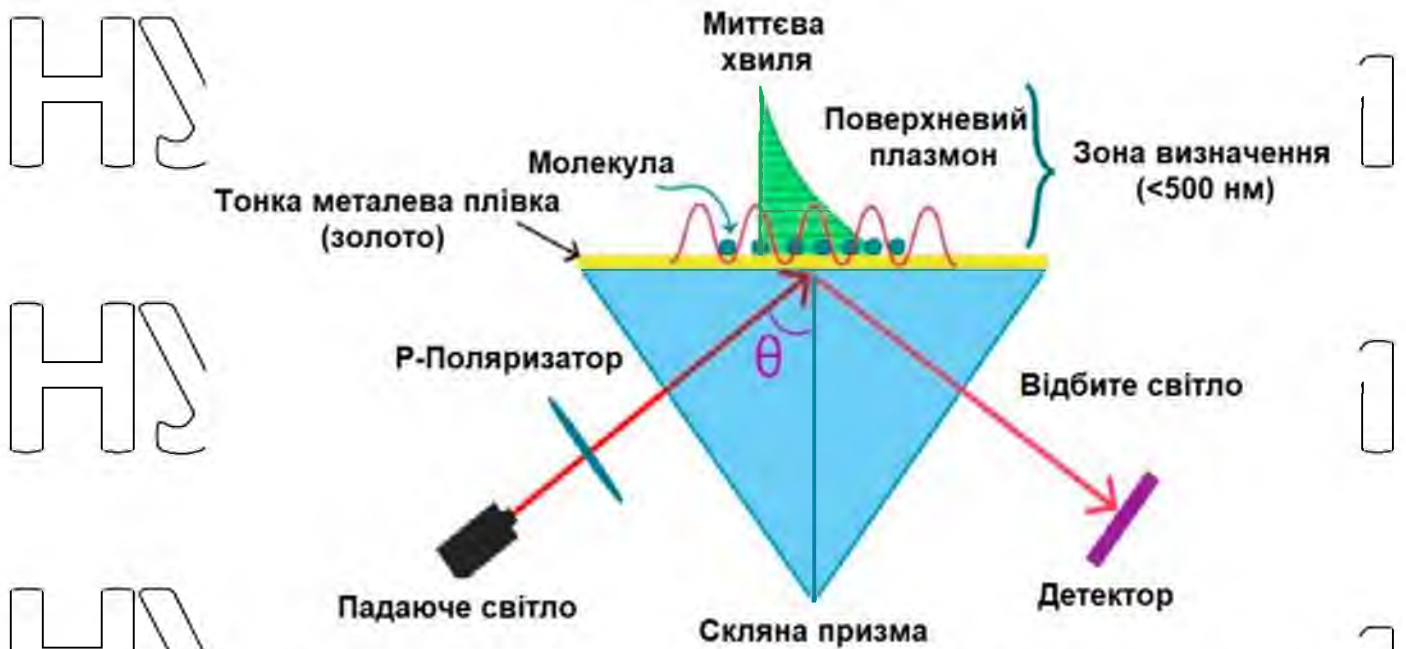


Рис. 1.7 ППР через конфігурацію Кречмана [19]

Світло фокусується на металеву плівку крізь скляну призму і реєструється подальше відбиття. Під певним кутом падіння (або кутом резонансу) плазмони резонують з однаковою частотою світла, що призводить до поглинання світла під цим кутом. Це визначає темну лінію у відбитому промені. Ця темна лінія містить велику кількість інформації. Резонансний кут можна отримати, спостерігаючи провал в інтенсивності відбиття SPR.

Зміщення кривої відбивної здатності означає подію молекулярного зв'язування, що відбувається на металевій плівці або поблизу неї, або конформаційну зміну молекул, зв'язаних з плівкою. За допомогою моніторингу цей зсув у порівнянні з часом можна досліджувати події молекулярного зв'язування та кінетику зв'язування.

1.9.1 Переваги методу на основі поверхневого плазмонного резонансу

Біосенсори як діють за принципом ППР дозволяють здійснити швидке і точне вимірювання показника заломлення середовища і діагностику присутності специфічних речовин за зміною оптичних властивостей тонкого шару, що прилягає до поверхні SPR-сенсора.

Методи SPR популярні в сучасній розробці біосенсорів, оскільки це поверхнево-чутливий метод, який може вимірювати в реальному часі взаємодії між неміченими видами.

Метод дозволяє визначати кінетику біохімічних реакцій *in situ in situ*.

1.9.2 Недоліки методу на основі поверхневого плазмонного резонансу

Метод вимагає наявності спеціального обладнання, має низьку пропускну здатність, можна аналізувати лише 1-2 зразки одночасно.

Хоча SPR є простою технікою з рядом переваг, вона не є найчутливішою.

Крім цього головним обмеженням біосенсорів на основі SPR є те, що все, що змінює показник заломлення на сенсорній поверхні, заважатиме аналізу, включаючи неоднорідні (складні) матриці зразків і неспецифічні взаємодії зв'язування.

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

РОЗДІЛ 2 ОБ'ЄКТ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

НУБІП України

2.1 Підготовка рослинного матеріалу

Дослідження виконували у лабораторії кафедри екобіотехнології та біорізноманіття НУБіП України. У роботі використовували рослинний матеріал квасолі і картоплі.

Рослинний матеріал квасолі *Phaseolus vulgaris*, L.1753, сорту Пінто вирощували в лабораторних умовах, за температури 18-22 °С та 12 годинним світловим днем. Виявляли рослини із системною вірусною інфекцією, яка проявлялася у зниження розмірів рослин та деформації листкової пластинки. Рослинний матеріал перевіряли імуноферментним аналізом на вміст антигенів вірусу звичайної мозаїки квасолі та методом штучної інокуляції для підтвердження вірусної природи симптомів.

2.1.1 Штучна інокуляція рослин квасолі.

Інокуляцію здорових рослин квасолі, у яких не виявили вірусу звичайної мозаїки квасолі здійснювали за рекомендаціями, описаними в [34].

Механічна інокуляція передбачає введення інфекційного вірусу або вірусної РНК у рану на поверхні рослини. Коли вірус успішно закріплюється в клітині, відбувається зараження. Механічну інокуляцію виконували шляхом гомогенізації зараженої тканини листків квасолі в фосфатно-сольовому буфері з додаванням абразиву, такого як карборунд, з розмірами 400-600 меш. обережним втиранням екстракту в листя рослини-реципієнта. Спостерігали за розвитком симптомів протягом 10-14 днів після інокуляції.

Після інокуляції рослини витримували добу в притіненому стані, оскільки вважається, що інтенсивне освітлення в цей період може знизити ефективність інфікування. Карборунд з листків змивали. Проте навіть м'яке проведення процедури іноді завдавало рослині відчутних пошкоджень із відмиранням листкової тканини (Рис. 2.1). Однак, загалом штучне інокулювання дозволило передати вірус на здорові рослини.



Рис. 2.1. Розвиток симптомів мозаїки та скручування листків у рослині квасолі звичайної сорту Пінто при інскульції ізольованою із хворих рослин.

Листки рослин із симптомами вірусного інфікування збирали і висушували методом пресервації.

2.1.2. Вирощування рослин картоплі, системно інфікованих вірусом.

У лабораторних умовах за температури 18-22 °С бульби картоплі L., висаджували у горщики із комерційною поживною сумішшю «ґрунт спеціальний для вирощування овочевих і квіткових рослин», рН 5,8-6,2 з додаванням 1 частини перліту на 2 частини суміші. Рослини вирощували із бульб картоплі системно інфікованих S-вірусом картоплі (*Potato virus S*). Бульби були люб'язно надані Інститутом картоплярства НААН (Україна).

Рослини при досягненні висоти 15-20 см перевіряли на наявність вірусу методом ПРА, частину листків зрізали і піддавали пресервації висушуванням.

Після зберігання протягом 4 місяців рослинний матеріал картоплі перевіряли на наявність вірусних антигенів методом ІПР-аналізу.

2.2. Висушування рослинного матеріалу – метод пресервації

Для створення колекцій типових культур вірусів, а також для навчальних цілей і розробки діагностикумів необхідне зберігання ізолятів вірусу протягом тривалого періоду часу – місяців, а краще – років. Важливою умовою є збереження інерційності вірусних ізолятів, тобто здатності інфікувати рослину-хазяїна після тривалого зберігання ізоляту. Це необхідно для досліджень конкретного вірусу, оскільки такий вірусний ізолят може слугувати референтним матеріалом для постановки імунних методів виявлення вірусів, тобто виступати в якості діагностикуму.

Такі діагностикуми необхідні також для дослідження емерджентних вірусів – нових, що раніше не зустрічалися на даній території, і часто є передумовою для діагностики нових захворювань. Використовуючи спосіб зберігання вірусних ізолятів, заснований на пресервації, що включає дегідратацію рослинного матеріалу були одержані позитивні результати щодо збереження інфекційності великою кількістю вірусів [15].

Листя рослин, в яких діагностували наявність вірусу, розрізали на шматки і сушили над десикантом. Хімічні зневоднюючі агенти, висушувальні засоби, речовини, здатні поглинати або хімічно здатні зв'язувати воду середовища, тобто десиканти. Ліофілізований рослинний матеріал зберігали у лабораторних пробірках при 0-4 °С у холодильнику. Через 6 місяців зберігання проводили перевірку збереження вірусу у дегідратованому матеріалі методом ІПР-аналізу.

2.4. Імуноферментний аналіз

ІФА у варіанті «сендвіч» з подвійними антитілами проводили з використанням полістирольних плат для мікротитрування згідно з методикою

антитіла з універсального аналізу виявлення *Bean Common Mosaic Virus* та

Гетерогенний твердофазний ІФА у варіанті «сендвіч» включає кілька основних етапів та допоміжних процедур.

Допоміжні процедури включали приготування буферів і зразків. Приготування буферів проводили відповідно до рекомендацій [76]. Усі буфери зберігали при 4°C протягом 1 місяця після приготування. Використовували готові буфери при кімнатній температурі (20-25°C) (Додаток, табл.1). Зразки рослинного матеріалу гомогенізували у буфері для екстракції з розведенням у співвідношенні 1:20 (мас./об.).

Основні етапи процедури ІФА:

1) іммобілізація антитіла на твердій фазі – імуносорбція специфічних до антигена антитіл (утворення імуносорбенту);

2) видалення незв'язаних компонентів, блокування сайтів зв'язування на твердій основі за допомогою білків-блокаторів (BSA);

3) нанесення аналізованого антигену і зв'язування його з імуносорбентом на твердій фазі; зв'язування відбувається при 37 °C у термостаті із забезпеченням високої вологості середовища;

4) видалення незв'язаних компонентів промиванням лунк буфером для промивання;

5) нанесення антитіл, мічених ферментом, утворення імуного комплексу між антигеном і міченими антитілами; інкубація при 37 °C у термостаті із забезпеченням високої вологості середовища;

6) видалення незв'язаних компонентів промиванням лунк буфером для промивання;

6) детекція імуного комплексу завдяки ферментативній активності мітки із субстратом – візуалізація імуного зв'язування між антитілом і антигеном.

Кількісне визначення досліджуваної речовини здійснюється шляхом додавання відповідного для використовуваного детектора субстрату і порівняння сигналу досліджуваної речовини із стандартним зразком.

Буфери та умови інкубації були адаптовані до тих умов, які рекомендував виробник аналізу. Як негативний контроль використовували сік здорових візуально рослин. Поглинання вимірювали при 405 нм за допомогою спектрофотометра Термо Labsystems OpsiS MR (TermoFisher, США) із програмним забезпеченням після інкубації із субстратом (1 мг/мл паранітрофенілфосфату) протягом 30 хв, 1 год та 2 год.

Для оцінки межі виявлення результат вважався позитивним, якщо вимірне значення OD₄₀₅ було принаймні вдвічі більшим за негативний контроль.

2.3. Буфери і реагенти для роботи оптичного ППР- біосенсора

2.3.1 Системний буфер.

Базовий або системний буфер повинен створювати оптимальні фізіологічні умови для зв'язування аналіту з лігандом. Для біомолекулярних взаємодій базовий або системний буфер зазвичай є фізіологічним буфером із достатньою кількістю солі та майже нейтральним рН. Фосфатно-сольовий розчин (PBS) є стандартним системним буфером. У роботі використовували PBS-буфер за прописом (табл. 2.1).

Таблиця 2.1

Фосфатно-сольовий буфер [14]

Реагент	Концентрація, 1×
Міс	
с	
т,	
г/л	

г	г
2	г
4	г
4	г
2	г
4	г
г	г

Розчин готували безпосередньо перед проведенням аналізу. PBS можна виготовляти як 1× розчин або як 10× запас. Щоб приготувати 1 л 1× розчиняли реагенти, перелічені вище, у 800 мл H₂O поступово, додаючи кожен реагент після розчинення попереднього. Доводили рН до 7,4 за допомогою 1 н HCl, а потім додавали H₂O до 1 л. Зберігали PBS при кімнатній температурі.

2.2.2 Регенераційний буфер [14].

Для багаторазового використання того самого сенсорного чіпа поверхня повинна бути регенована шляхом видалення аналіту та будь-якого іншого нековалентно зв'язаного матеріалу. Однак ліганд повинен залишатися недоторканим і не повинен інактивуватися або денатуруватися під час фази

регенерації. Зазвичай використовують розчини для регенерації з низьким рН.

Для регенерації поверхні біосенсора використовували наступні розчини:

100 мМ $MgCl_2$;

100 мМ гліцин* HCl, (рН 3,0);

100 мМ фосфорної кислоти (рН 3,0);

10 мМ гліцин* HCl, (рН 2,5).

Оптимальна регенерація сенсора включає рН-шок, тому регенерацію виконували у вигляді двох послідовних етапів по 30 с кожен. Біосенсор занурювали у розчин на відповідний час, а далі промивали дистильованою водою.

2.4. Тестування зразків рослинного матеріалу методом ППР-аналізу для розробки діагностикумів

Прилад "Плазмонтест" розроблений у відділі сенсорних пристроїв, систем та технологій безконтактної діагностики Інституту кібернетики імені В.М. Глушкова НАН України і використовується для лабораторних досліджень, а також може бути використаний для виконання аналізів у мобільному режимі у польових умовах.

Призначення ППР-сенсорів – швидко і точно визначати показник заломлення середовища та/або діагностувати наявність конкретної речовини шляхом зміни оптичних характеристик тонкого шару, прилеглого до поверхні ППР-датчика. У порівнянні з класичними методами, метод SPR дає можливість спостерігати кінетику біохімічних реакцій *in situ* [89]. Це важливо при розробці діагностикумів для виявлення різних патогенів, у тому числі вірусів рослин.

Робота приладу базується на збудженні плазмонів на поверхні трансдюсера – скляної пластинки, покритої тонким шаром наночасток золота. Збудження генерується системою на основі стаціонарної напівциліндричної призми та напівпровідникового лазера з довжиною хвилі 635 нм з колінеарним пучком.

Зміна кута падіння світла на трансд'юсер та відбитого світла на детекторі випромінювання досягається обертанням лазера та фотодіода, розташованих на протилежних плечах навколо поздовжньої осі призми, за допомогою крокового двигуна. Діапазон кутів становить 40° – 70° , мінімальний крок $0,03$ градуса. Програмне забезпечення пристрою дозволяє встановити 10 серій на 10 кривих ППР, визначити положення мінімуму ППР при наближенні поліномом 3-го порядку, побудувати сенсограму змін кута ППР за часом [89].

Принципова схема роботи ППР-біосенсора (Рис. 2.2).

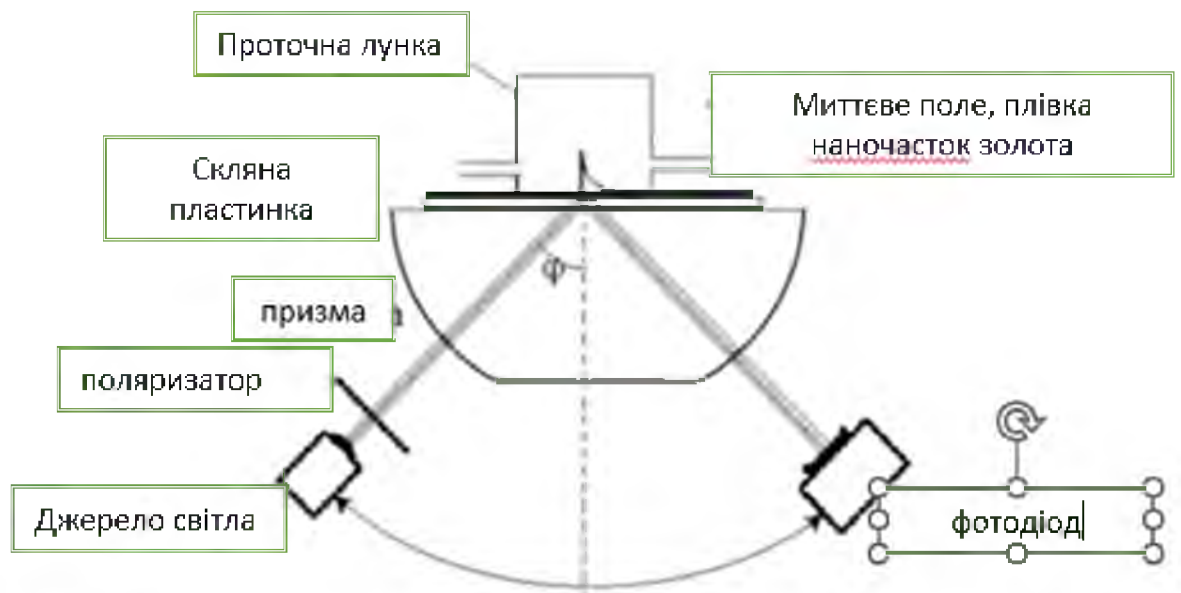


Рис. 2.2. Схема роботи комп'ютеризованого приладу «Плазмонтест-Лаб»

Біосенсор представляє собою пристрій, який функціоналізується біомолекулами (наприклад, антитілами), що можуть вступати у реакцію зв'язування із специфічним антигеном на поверхні пристрою. Розчин антигена пропускають проточною лункою, таким чином, прилад реєструє кінетику реакції зв'язування в режимі реального часу (рис. 2.3).



Рис. 2.3. Зовнішній вигляд ППР-біосенсора «Плазидтест»

Зміни, що відбуваються на поверхні трансдюсера збуджують миттєве поле. В електромагнетиці миттєве поле, або миттєва хвиля, — це коливальне електричне та/або магнітне поле, яке не поширюється як електромагнітна хвиля, але енергія якого просторово зосереджена поблизу джерела (коливальні заряди та струми). Це впливає на кут відбивання поляризованого світла, що фіксується фотодіодною системою.

Визначення імунного комплексу вірус-антитіло на поверхні ППР-біосенсора проводили за наступною схемою:

- 1 – нанесення проміжного шару для підвищення зв'язування ліганда з поверхнею;
- 2 – іммобілізація ліганда – антитіл до відповідного рослинного вірусу;
- 3 – нанесення аналіту – освітленого гомогенату рослинного матеріалу, зв'язування аналіту – антигенів капсидних білків вірусу з лігандом;
4. - оптичне розпізнавання взаємодії антиген-антитіло ППР-приладом.

Гомогенат рослинного матеріалу освітлювали центрифугуванням при 3000 g продовж 5 хв.

2.5. Статистичні методи дослідження

Для обробки результатів використовували пакет прикладних аналізів ANOVA для MS Excel. Визначення статистичної достовірності показників проводили із застосуванням критерію Стьюдента. Різницю вважали достовірною на рівні значущості 95 % ($p \leq 0,05$) [88]. Групи даних включали показники оптичної щільності імуноферментної реакції, зміни резонансного кута, для яких розраховували середнє арифметичне із стандартною середньою похибкою. У експериментах середнє визначали як значення, отримане для двох-трьох повторів.

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

3.1. Візуальні методи дослідження рослинного матеріалу на прояв вірусної інфекції

Рослини квасолі, інфіковані вірусом, демонстрували спектр симптомів: мозаїку, скручування листків, деформацію листкової пластинки (Рис 3.1).



Рис. 3.1. Візуальні симптоми вірусної інфекції на рослині квасолі: а) мозаїка; б) скручування листків; с) деформація листкової пластинки; д) здорова рослина

Таким чином, шляхом штучної інюкуляції вдалося передати вірус та накопичити вірусний рослинний матеріал.

Виявлення симптомів дозволило припустити, що інфекційним агентом виступає вірус звичайної мозаїки квасолі (ВЗМК, *Bean common mosaic virus*), оскільки їх опис збігається із відомим описом симптомів цього вірусу на рослинах квасолі. Поведений пошук та огляд літератури [31], а також проведене у подальшому діагностування ІФА, підтвердили це припущення.

На рослинах картоплі, вирощених із бульб, інфікованих PVS, не виявили відмітних симптомів вірусного інфікування, що є типовим для цього вірусу. Рослини нормально розвивалися і цвіли в умовах лабораторії (Рис. 3.2).



Рис.3.2. Рослини картоплі, інфіковані PVS

Опис візуальних симптомів PVS на картоплі обмежується легким хлорозом, легкою зморшкуватістю листкової пластинки і хвилястістю її країв культури картоплі. Наявність вірусу в подальшому була підтверджена результатами ІФА (Рис.3.3).

Рис.3.3. Виявлення антигенів вірусів BCMV і PVS у рослинному матеріалі квасолі та картоплі імуноферментним аналізом

Вміст антигенів вірусів BCMV і PVS у рослинному матеріалі був на рівні позитивного контролю для обох вірусів і перевищував негативний контроль у 14 та 11 раз для квасолі і картоплі, відповідно. Це є підтвердженням наявності відповідних вірусів у рослинному матеріалі.

Таким чином, в лабораторних умовах був накопичений вірусний рослинний матеріал для створення діагностикумів – позитивних контролів для імуноферментного аналізу. Для кожного тесту ELISA існують позитивні та негативні контролі, які мають бути з того самого генотипу (генотипів), що й досліджувані зразки. Це важливо, оскільки знижує фонові реакції в ІФА і дозволяє отримувати високоспецифічні результати. Позитивні і негативні контролі використовуються для визначення зараженості зразків. Зразки матеріалу, які використовуються для негативного контролю, також повинні походити з рослини, яка давала негативний результат на вірусну інфекцію.

3.2 Дослідження методом ІФА зразків рослинного матеріалу після зневоднення і тривалого зберігання

Збереження або пресервація (анг. *preservation*) рослинного вірусу є фундаментальною вимогою для всіх типів досліджень, пов'язаних з вірусами, і прикладних застосувань, таких як підготовка антигену для виявлення вірусу імунологічними методами, генетичної трансформація для отримання патогенів, отримання стійких трансгенних рослин [42, 70] та біонанотехнології для отримання нанопрепаратів [63, 43]. Віруси рослин є облигатними внутрішньоклітинними паразитами, які розмножуються лише всередині живих клітин хазяїна, тому не можуть жити без живих тканин. У минулому були розроблені різні стратегії для збереження вірусів рослин, включаючи заморожування, сублімаційне сушіння, дегідратацію шляхом фізичного сушіння і хімічних речовин, а також культуру *in vitro*, серед яких найпоширенішим і надійнішим методом було сублімаційне сушіння [81].

Проте, було показано, наприклад, що вірус огіркової мозаїки, ліофілізований у листках чи соку рослини, міг зберігатися до 240 днів у захищеному середовищі, що містило 5% (маса/об'єм) сорбітолу та 3,6% (маса/об'єм) декстрану, ефективність інфікування такого зразка швидко знижувалася в міру тривалості періоду зберігання [86].

Крім того, необхідна адекватна процедура діагностики з правильною ідентифікацією вірусу та визначенням його розповсюдження в полі, що є важливими для встановлення ефективних заходів контролю. З цієї причини були розроблені біологічні, серологічні та молекулярні методи ідентифікації та виявлення вірусних інфекцій рослин у польових умовах. Серологічні методи були найбільш використовуваними методами для швидкого та ефективного виявлення рослинних вірусів у кількох зразках рослин, у тому числі в програмах виробництва вільного від вірусів рослинного матеріалу. Крім високої точності виявлення вірусних антигенів, методи [57, 85].

Імуноаналіз – це лабораторний метод, заснований на зв'язуванні антигену з його гомологічним антитілом для ідентифікації та кількісного визначення специфічного антигену або антитіла в зразку. У класичних імуноаналізах визначення концентрації аналіту ґрунтується на сигналах, створених різними мітками (флуоресцентними барвниками, ферментами або радіоізотопами), прикріпленими до антигенів або антитіл [83]. Для виконання імуноаналізу необхідні в якості позитивного контролю добре збережені зразки вірусу, які є показниками правильного проходження імуноферментної реакції. Важливо, щоб використання таких контролів у виконанні методу було технологічним і відповідало вимогам стандартизації методу в лабораторії.

У наших дослідженнях виявили, що, через 6 місяців зберігання дегідратованого рослинного матеріалу, вміст антигенів PVS та BCMV суттєво не змінився (Рис.3.4).

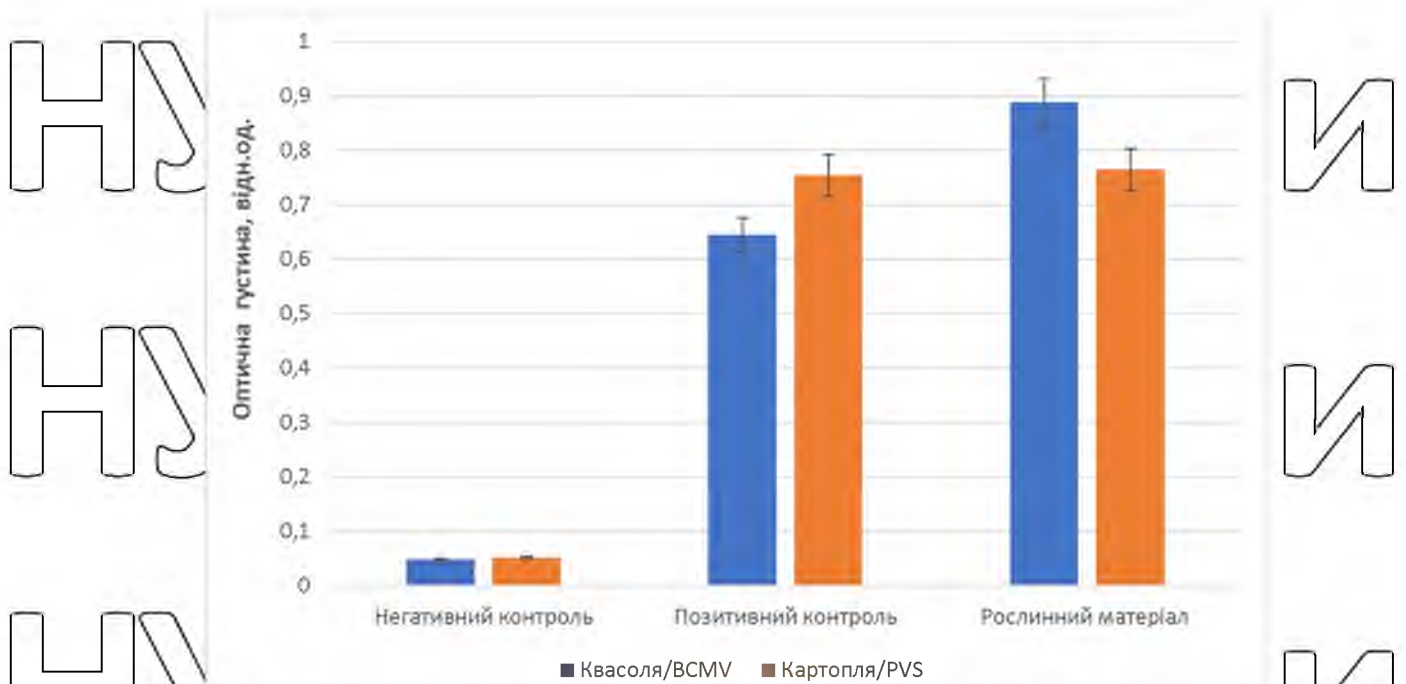


Рис. 3.4. Результати ІФА інфікованого рослинного матеріалу

Значення оптичної густини імуноферментної реакції перевищували показники негативного контролю у 15-18 раз для матеріалу квасолі і картоплі, відповідно, та знаходилися на рівні стандартного позитивного контролю, що можна вважати прийнятним для рекомендації таких зразків в якості позитивних контролів у дослідженнях вірусів BSMV та PVS у цих культурах.

Тривале зберігання антигенних властивостей двох вірусів, які належить до різних родів і інфікують неспоріднені культури рослин, дозволяє припустити, що розроблений метод зберігання вірусного матеріалу може бути використаний для широкого кола рослинних вірусів. Це дозволить активно розробляти вітчизняні діагностичку і покращить та активізує роботу випробувальних лабораторій

ПНР-аналіз зразків дегідратованого рослинного матеріалу після тривалого зберігання

Кон'югація з міткою може порушити сайти зв'язування, залучені у взаємодію між лігандом, наприклад, антитілом і аналітом – антигеном.

Крім того, мічення викликає неоднорідність біомолекулярної взаємодії, оскільки в більшості випадків мічення конкретної молекули (наприклад, антитіла) не є однорідним. Відомо, що сама мітка може взаємодіяти з

лігандами захоплення, що призводить до хибно-позитивних результатів. Таким чином, для роботи у випробувальних лабораторіях необхідно використовувати метод, який був би позбавлений означених недоліків.

Ще одним із процесів, який потребує корегування і застосовується при використанні у роботі випробувальних лабораторій стандартних наборів діагностикумів, що поставляються відповідними компаніями-виробниками, є перевірка стану збереження позитивних і негативних контролів. Насправді, процедура зберігання вимагає розведення ліофілізованих позитивних і негативних контролів буфером, розділення суспензії на аліквоти та заморожування їх при температурі -20°C . По мірі необхідності аліквоти використовують при проведенні ІФА, але ця процедура може впливати на збереження антигенів у позитивному контролі, і є необхідність їхньої перевірки. Так само, і збереження активності антитіл по відношенню до відповідного антигена повинне перевірятися при знаходженні реагентів тривалий час в умовах холодового зберігання. Оптимальним є використання методу, який в режимі реального часу та за короткий період робочого часу може здійснити такі дослідження. Саме використання ППР-біосенсора дозволяє перевірити як збереження реагентів – антитіл, так і вміст антигенів у позитивних контролях, оскільки метод демонструє кінетику реакції між антитілом та антигеном в реальному часі, а сама процедура перевірки окремого зразка антитіл чи позитивного контролю займає 45-60 хв. Метою наших досліджень з використанням ППР-біосенсора було виявлення збереження антигенів вірусів BCMV і PVS у дегідратованому рослинному матеріалі та розробка технологічних підходів у використанні такого матеріалу в якості позитивних контролів для ІФА.

Результати дослідження з використанням ППР-біосенсора показали, що антигени вірусів у дегідратованому матеріалі добре збереглися протягом 6 місяців (Рис. 3.5). Антигени PVS зв'язувалися на поверхні трансдюсера зі специфічними їм антитілами. Реакція взаємодії «антиген-антитіло» призводила до зміни резонансного кута

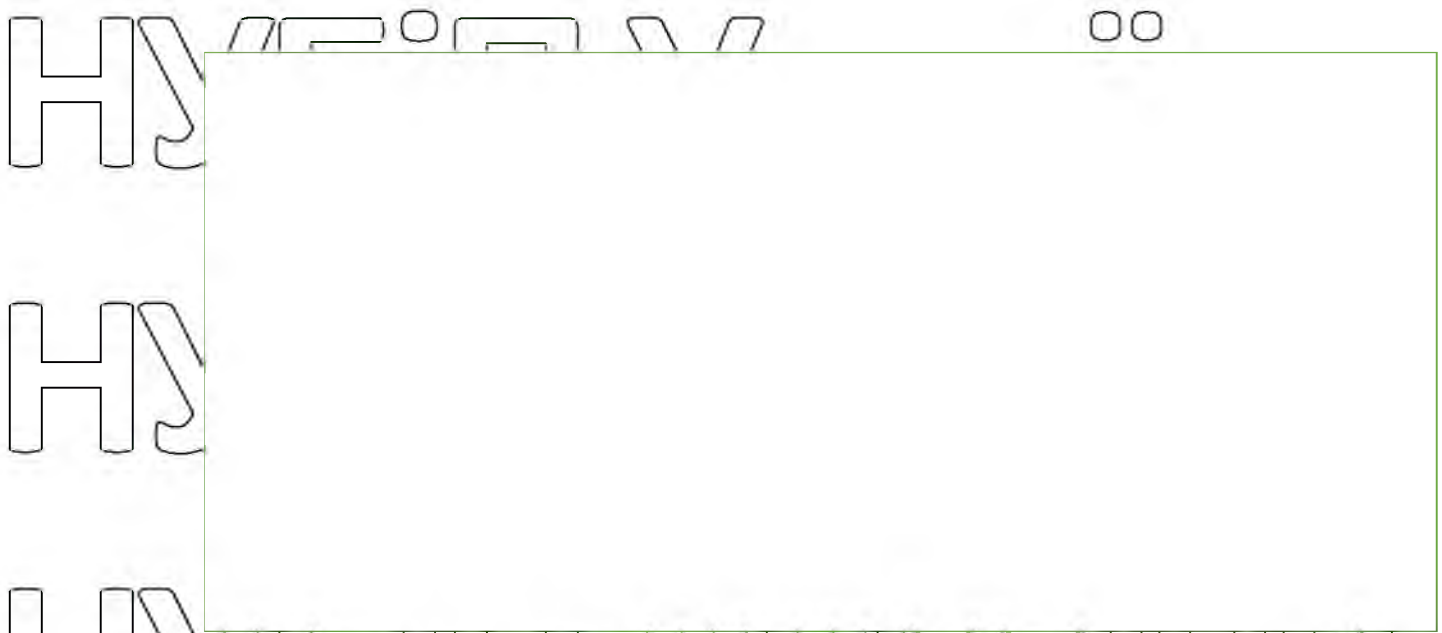


Рис. 3.5 Сенсограма PVS



Рис. 3.5 Сенсограма BCMV

НУБІП України

НУБІП України

ВИСНОВКИ

1. Методом ІФА підтверджене збереження антигенних властивостей S-вірусу картоплі у дегідратованих рослинних зразках картоплі протягом 6 місяців за умов зниженої температури 4 С. Показники оптичної густини інфікованого дегідратованого рослинного матеріалу у 15 раз перевищували показники негативного контролю, що підтверджу наявність високих рівнів антигенів у таких зразках.

2. Підтверджене збереження антигенних властивостей вірусу звичайної мозаїки квасолі у дегідратованих рослинних зразках квасолі протягом 6 місяців за умов зниженої температури 4 С. Значення оптичної густини в реакції ІФА перевищувало негативний контроль у 18 раз.

3. Показано, що імуноаналіз з використанням ППР-біосенсору дозволяє виявити взаємодію між антитілами та антигенами S-вірусу картоплі без використання мітки. Показники відхилення резонансного кута становили 0,2-0,3 градуса та добре реєструвалися.

4. Виявлено, що антигени ВСМВ активно зв'язувалися на поверхні ППР-біосенсору з антитілами, зсув резонансного кута становив 0,3-0,4 градуса та добре реєструвався. Це свідчить про виявлення взаємодії «антиген-антитіло»

5. Розроблені підходи до створення препаратів позитивних контролів двох рослинних вірусів – ВСМВ та PVS для виконання імуноферментного аналізу при випробуванні рослинного матеріалу на наявність вірусів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

НУБІП України

09-111

1545, John, S., A. M. Dasgupta, 2009, 0545 Gopal, D.V.R. Development of loop-mediated isothermal amplification and SYBR green real-time PCR methods for the detection of Citrus yellow mosaic badnavirus in citrus species. *J. Virol. Methods* 2014, 203, 1–6.

НУБІП України

aba, A.; Park, M.-K.; Advincula, R.C.; Knoll, W. Simultaneous surface plasmon optical and electrochemical investigation of layer-by-layer self-assembled conducting ultrathin polymer films. *Langmuir* 2002, 18, 4648–4652,

НУБІП України

sensors Actuators B Chem. 1999, 54, 145–165, doi:10.1016/S0925-4005(98)00333-

n, UK, 2020; pp. 27–38.

НУБІП України

2003 1Bdo Stok, E./j. Gurusia, 2011, 1200 Kennedy, R.J. Antibody-based sensors: *Sensors* 2009, 9, 4407–4445, doi:10.3390/s90604407.

НУБІП України

., Koganezawa, K., Eds.; APS Press: St. Paul, MN, USA, 1998; pp. 399–416.
s, 1988, 16, 11141–11156.

lark, M.F.; Adams, A.N. Characteristics of the microplate method of enzyme linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 1977, 34, 475–

НУБІП України

n plant virology) In *Methods in Virology*; Maramorosch, K., Koprowski, H., Eds.; Academic Press: New York, NY, USA, 1984; pp. 51–85.

НУБІП України

in antigen-coated tubes. *J. Immunol.* 1972, 109, 129–135.

ngvall, R.; Perlmann, P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 1971, 8, 871–874.
S.M. Detection of two orchid viruses using quartz crystal microbalance (QCM) immunosensors. *J. Virol. Meth.* 2002, 99, 71–79.

with strains of Citrus tristeza virus does not exclude superinfection by other strains of the virus. *J. Virol.* 2010, 84, 1314–1325.
ox, J.L.; Klass, M. Antigens produced by recombinant DNA technology. *Clin. Chem.* 1989, 35, 1838–1842.

hopoulos, Y.; Kintzios, S.; Moschopoulou, G.; Yialouris, C.P. Artificial neural network selection for the detection of plant viruses. *World J. Agric. Res.* 2008, 4, 114–120.

ambino, G. Multiplex RT-PCR method for the simultaneous detection of nine grapevine viruses. *Mol. Biotechnol.* 2005, 18, 1236–1247.
; Li, X.; Park, C.; Leung, W.Y.; Roberts, L. Comparison of nucleic acid gel stains cell permeability, safety, and sensitivity of ethidium bromide alternatives. *Biotium* 2017, 1–4.

ančinský R., Mihálik D., Mrkvová M., Candresse T., Glasa M. Plant viruses proteins. *Adv. Funct. Mater.* 2006, 16, 1269–1278.

:933–934. doi: 10.1016/j.molp.2020.06.007.

irus. *Anal. Methods* 2014, 6, 4530–4536.

ull, Roger/ *Comparative plant virology*. Academic press, 2009. – 393 p.
ranscription polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods* 2002, 106, 235–239.

:362–370. doi: 10.1111/aab.12029.

detection. *J. Virol. Methods* 2014, 196, 7–14.

onig, B.; Gratzel, M. Development of piezoelectric immunosensors for the detection of human erythrocytes. *Analyt. Chim. Acta* 1993, 276, 329–333.

s, P. A quartz crystal biosensor for measurement in liquids. *Biosensors Bioelectr.* 1992, 7, 397–404.

uman, S.; Singh, L.; Ram, R.; Zaidi, A.A.; Hallan, V. Simultaneous detection of major

avers, C.; Harris, R.; Hao, S.; Wilkinson, J.; O'Dwyer, K.; Brust, M.; Schiffrin, D. Electrochemically-controlled wave-guide-coupled surface plasmon sensing. *J.*

Electroanal. Chem. 1995, 387, 11–22. doi:10.1016/0022-0728(95)03865-e.

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:

bionanotechnology. *Curr Top Microbiol.* 2011;375:61–87 doi:

ackay, I.M. Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clin. Microbiol. Infect.* 2004, 10, 190–212.

Acids Res. 2002, 30, 1292–1305.

alecka, K.; Michalczuk, L.; Radecka, H.; Radecki, J. Ion-Channel genosensor for the detection of specific DNA sequences derived from Plum pox virus in plant extracts.

Sensors 2014, 14, 18611–18624.

an reaction assay for simultaneous detection of clostero-, badna- and mandari-
viruses along with *Clavosporium* bacteria in citrus trees. *J. Virol. Methods* 2016,

135, 58–64.

RT-PCR assays with co-amplification of plant mRNA as internal control. *J. Virol. Methods* 2002, 99, 81–92.

irmajlessi, S.M.; Loit, E.; Mänd, M.; Mansouripour, S.M. Real-time PCR applied to study on plant pathogens: Potential applications in diagnosis—a review. *Plant. Protect. Sci.* 2015, 51, 177–190.

itchell, J.S. Small molecule immunosensing using surface plasmon resonance. *Sensors* 2010, 10, 7323–7346, doi:10.3390/s100807323.

enzymatic amplification of DNA in vitro. The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symposia Quant. Biol.* 1986, 51, 263–273.

in Sub Saharan Africa organized by IITA; Ibadan, Nigeria. 4–8 June 2001; pp. 233–

gron [Internet]. – 2017. - V.48(1). - P 216–220. doi: 10.5935/1806-6690.20170025.

allás, W.; Sánchez-Navarro, J.A.; James, D. Recent advances on the multiplex molecular detection of plant viruses and viroids. *Front. Microbiol.* 2018, 9, 2087–

nz, K.A.; Georgiadis, R. In situ kinetics of self-assembly by surface plasmon resonance spectroscopy. *Langmuir* 1996, 12, 4731–4740, doi:10.1021/la950845z.

infection of grapevines with multiple viruses. *Virus Res.* 2007, 124, 151–159.

ackus, D.G.; Shamsi, M.H.; Wheeler, A.R. Electrochemistry, biosensors and microfluidics: A convergence of fields. *Chem. Soc. Rev.* 2015, 44, 5320–5340.

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.

S.M., Lim L. Y. Application of plant viruses as nano drug delivery systems// *Pharm Res.* - 2010. - V.27. - P 2509–13. doi: 10.3390/molecules23092311

er, F. Simple and portable magnetic immunoassay for rapid detection and sensitive quantification of plant viruses. *Appl. Environ. Microbiol.* 2015, 81, 3039–3048.

ojas M.R., Gilbertson R.L. Emerging plant viruses: A diversity of mechanisms and opportunities. In: Roossinck M.J., editor. *Plant Virus Evolution*. Springer; Berlin/Heidelberg, Germany: 2008. pp. 27–51.

auerbrey, G. Verwendung von Schwingquarzen zur Wägung dünner Schichten und zur Mikrowägung // Z. Physik 1959, 155, 206–222.

ta streak mysore virus and banana bunchy top virus using multiplex RT-PCR. Curr. Sci. 2011, 100, 31–34.

munosensor for the detection of Capsicum chlorosis virus in bell pepper. Arch. Virol. 2017, 161, 10470–1052; doi:10.1007/s12018.01.001.

at protein. J. Virol. Methods 2014, 207, 86–94.

harma, S.K.; Sehgal, N.; Kumar, A. Biomolecules for development of biosensors and their applications. Curr. Appl. Phys. 2003, 3, 307–316.

e

s

garia spp in combination with a plant mRNA specific internal control. J. Virol. Methods 2003, 111, 85–93.

an Regenmortel, M.H.V. Serology and Immunochemistry of Plant. Viruses, 1st ed.; Academic Press: New York, NY, USA, 1982; pp. 10–308.

virus: a novel biotechnology for long-term preservation of virus in shoot tips // Plant. Methods. – 2018. – V.14, 47. DOI <https://doi.org/10.1186/s13007-018-0312-9>

l

ild David The Immunoassay Handbook. Theory and Applications of Ligand Binding. ELISA and Related Techniques/ 4th ed. - Elsevier Science, 2013 – 618 p.

Re DNA based voltammetric electrochemical determination. Am. J. Plant. Sci. 2014, 5, 2256–2268.

avier C.A.D., Whitfield A.E. Plant virology // Curr Biol. - 2023 – V. 33(11). – P. 478-

n

ft. Prediction of the preservation of freeze-dried cucumber mosaic virus // Biotechnol. Lett. – 2000. – №22. – P. 1779–82.

S

c

.

:1–15. doi: 10.1016/j.asa.2019.11.056.

Атраментова Л. О. Статистичні методи в біології: підручник для огуд. вищ. навч. закл. / Атраментова Л. О., Утєвська О. М. – Горлівка: «Видавництво Ліхтар», 2008. - 248 с.

Абедева Т.С., Мінов Ю.Д., Сутковий П.Г., Фролов Ю.О., Шпильовий П.Б., Стародуб М.Ф. Розробка та використання приладів на основі поверхневого резонансу. Cybernetics and Computer Technologies. 2020. 1. С. 62–73.

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

ДОДАТКИ Додаток 1 НУБІП України

Таблиця 1

Буфери для проведення імуноферментного аналізу

Реагент	Маса, г
Буфер для промивання з Твін-20, рН 7,4 на 1000 мл	
Буфер для покриття (рН 9,6; на 1000 мл)	
Буфер для кон'югату (рН 7,4; на 1000 мл)	
MgCl ₂ · 6 H ₂ O	
Субстратний буфер (рН 9,8; на 1000 мл)	
Екстракційний буфер «Загальний» (рН 7,4, на 1000 мл)	

НУБІ! ПІДНІ
УКРАЇНИ

НУБІ! ПІДНІ
УКРАЇНИ

НУБІ! ПІДНІ
УКРАЇНИ

НУБІ! ПІДНІ
УКРАЇНИ

НУБІ! ПІДНІ
УКРАЇНИ

НУБІ! ПІДНІ
УКРАЇНИ

НУБІ! ПІДНІ	УКРАЇНИ
НУБІ! ПІДНІ	УКРАЇНИ
НУБІ! ПІДНІ	УКРАЇНИ
НУБІ! ПІДНІ	УКРАЇНИ