



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **50061** (13) **U**
(51) МПК (2009)
A01M 1/20МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ**ОПИС**
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту**(54) СПОСІБ ВИЯВЛЕННЯ ДНК ВІРУСУ ЯДЕРНОГО ПОЛІЕДРОЗУ НЕПАРНОГО ШОВКОПРЯДА**

1

2

(21) u200911837

(22) 19.11.2009

(24) 25.05.2010

(46) 25.05.2010, Бюл.№ 10, 2010 р.

(72) ОБЕРЕМОК ВОЛОДИМИР ВОЛОДИМИРОВИЧ, СІМЧУК АНДРІЙ ПАВЛОВИЧ, РАЗУМЕЙКО ВОЛОДИМИР МИКОЛАЙОВИЧ, ІВАШОВ АНАТОЛІЙ ВАСИЛЬОВИЧ

(73) ТАВРІЙСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМ. В.І. ВЕРНАДСЬКОГО

(57) Спосіб виявлення ДНК вірусу ядерного поліедрозу непарного шовкопряда, що включає ідентифікацію ДНК вірусу, при якому тканину комахи гомогенізують, який **відрізняється** тим, що ДНК виділяють з гомогенату, ампліфікують його з використанням двох специфічних праймерів: 5'- ACG TTC TCG TTG AAC GTG CTG -3'; 5'- CTG GTG AAC CAC AAA ACC CTG -3' та виділяють ДНК-фрагмент довжиною 524 п.н.

Технічне рішення належить до області сільськогосподарства.

Відомо спосіб виявлення поліедрів вірусу ядерного непарного шовкопряда [Гулий В.В., Рибина С.Ю. Вирусные болезни насекомых и их диагностика. - Кишинёв, 1988. - 187с; Тарасевич Л.М. Вирусы насекомых. - М: Наука, 1975. - 245с.]. Даний спосіб ідентифікації поліедрів вірусу ядерного поліедрозу непарного шовкопряда включає мікроскопування зрізів і гомогенатів уражених вірусом тканин комахи, визначення локалізації поліедрів, їх форми і розмірів, за значенням яких ідентифікують поліедри вірусу.

За найближчий аналог обрано спосіб виявлення поліедрів вірусу ядерного поліедрозу непарного шовкопряда [Патент України на корисну модель №35990, МПК (2006) A01M 1/20 „Спосіб виявлення поліедрів вірусу ядерного поліедрозу непарного шовкопряда”, Опубл. 10.10.2008. Бюл. №19, Вініченко О.В., Оберемок В.В.]. Цей спосіб включає ідентифікацію поліедрів вірусу, при якому тканину комахи гомогенізують, гомогенат двічі фільтрують через газову тканину, потім фільтрат відстоюють і центрифугують, забирають надосадову рідину, з осаду виділяють ДНК, ампліфікують його з використанням двох специфічних праймерів: 5'-GCC GGC GGA ACT GGC CCA -3' (134843 - 134860); 5'-CGA CGT GGT GGC ACG GCC -3' (135159-135142) і виділяють ДНК - фрагмент довжиною 317п.н.

Недоліком найближчого аналога є те, що відомий спосіб не дозволяє діагностувати ДНК вірусу ядерного поліедрозу непарного шовкопряда

при наявності в досліджуваному матеріалі ДНК непарного шовкопряда.

В основу корисної моделі поставлене завдання вдосконалити спосіб виявлення ДНК вірусу шляхом підвищення специфічності віджигу праймерів.

Поставлене завдання вирішується таким чином, що спосіб виявлення ДНК вірусу ядерного поліедрозу непарного шовкопряда включає ідентифікацію ДНК вірусу, при якому тканину комахи гомогенізують, та відрізняється тим, що ДНК виділяють з гомогенату, ампліфікують його з використанням двох специфічних праймерів: 5'- ACG TTC TCG TTG AAC GTG CTG -3'; 5'- CTG GTG AAC CAC AAA ACC CTG -3' та виділяють ДНК - фрагмент довжиною 524п.н.

У корисній моделі, що заявляється, використовують більш довгі праймери; праймери підібрані за критеріями, які дозволяють досягти високої специфічності їх віджигу; праймери підібрані до ділянки гена, який більш характерний для геному вірусу, ніж геному комахи.

Спосіб, що заявляють, дозволяє діагностувати ДНК вірусу ядерного поліедрозу непарного шовкопряда, по-перше, при наявності в матеріалі ДНК непарного шовкопряда; по-друге - діагностувати ДНК вірусу ядерного поліедрозу непарного шовкопряда з більшою точністю.

Приклад виконання способу.

Для виявлення ДНК вірусу ядерного поліедрозу непарного шовкопряда використали вірусний препарат з Кітаю. Екстракцію тотальної ДНК проводили з використанням комплекта «ДНК-сорб-А»

(19) **UA** (11) **50061** (13) **U**

варіант 100 фірми АмпліСенс (за інструкцією). PCR проводили в реакційній суміші об'ємом 29мкл на термоциклері «Терцик» (ДНК-Технологія, Росія) з використанням реактивів для полімеразної ланцюгової реакції «АмпліСенс-200-1» (АмпліСенс, Москва). Реакційна суміш об'ємом 29мкл містила: 5-х PCR-буфер - 5мкл; $MgSO_4$, 50Мм - 1.5мкл; H_2O MilliQ - 3мкл; dNTP-mix - 2.5мкл, 2Мм; T_{aq} -полімераза, 5од/мкл - 0.5мкл; мінеральне масло - 10.5мкл; 2 праймера, A_{260} 100Е/мл - по 1мкл; ТЕ-буфер з ДНК, що досліджується - 5мкл. PCR проводили в режимі: денатурація 93°C - 1хв., віджиг 35°C - 1хв., синтез 72°C - 1хв. - 5 циклів; денатурація 93°C - 0.5хв. віджиг 35°C - 0.5хв., синтез 72°C - 0.5хв. - 40 циклів. Термінальну стадію синтезу проводили при 72°C - 3хв. Продукти ампліфікації розділяли за методом електрофорезу в 1,8%-ному агарозному гелі. Для проведення PCR використані праймери, підібрані і сконструйовані на основі опублікованої у ICTVdB геномної послідовності вірусу ядерного полієдрозу непарного шовкопряда (AF081810). Послідовності двох специфі-

чних праймерів були наступними: а) ACG TTC TCG TTG AAC GTG CTG; б) CTG GTG AAC CAC AAA ACC CTG. У якості маркера вірусної ДНК вибрали ділянку гена, який кодує білок капсиду вірусу (GeneID: 1488517). Ці два специфічні праймери в ході реакції ампліфікації за наявності вірусної ДНК дають один ДНК-фрагмент довжиною 524п.н.

Спосіб представлено графічно.

Фіг. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК вірусу ядерного полієдрозу непарного шовкопряда: 1 - дослід; 2 - маркер молекулярних мас ДНК від 100 до 1000 пар нуклеотидів з кроком в 100 пар нуклеотидів і від 1000 до 3000п.н. з кроком в 1000п.н. (від низу до верху); 3 - контроль; F - фрагмент вірусної ДНК довжиною 524п.н.

Спосіб виявлення ДНК вірусу ядерного полієдрозу непарного шовкопряда, що заявляють цим технічним рішенням, володіє точною і здатний виявити присутність ДНК вірусу ядерного полієдрозу на різних етапах розвитку вірусної інфекції: від окультної і латентної до активної форми.

