

МІНІСТЕРСТВО АГРАРНОЇ ПОЛІТИКИ ТА ПРОДОВОЛЬСТВА УКРАЇНИ
МИКОЛАЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

ВІСНИК
АГРАРНОЇ НАУКИ ПРИЧОРНОМОР'Я
Науковий журнал

Виходить 4 рази на рік
Видається з березня 1997 р.

Випуск 3 (73) 2013

Миколаїв
2013

Засновник і видавець: Миколаївський національний аграрний університет.

Свідоцтво про державну реєстрацію КВ №19669-9469ПР від 11.01.2013.

Згідно з Постановою ВАК України від 14.04.2010 р. № 1-05/3 видання включено до переліку фахових видань.

Головний редактор: В.С. Шибанін, д.т.н., проф., чл.-кор. НААНУ

Заступники головного редактора:

І.І. Червен, д.е.н, проф.
К.М. Думенко, д.т.н., доц.
В.П. Клочан, к.е.н., доц.
М.І. Гиль, д.с.-г.н., проф.
В.В. Гамаюнова, д.с.-г.н., проф.

Відповідальний секретар: Н.В. Потриваєва, д.е.н., доц.

Члени редакційної колегії:

Економічні науки: О.В. Шибаніна, д.е.н., проф.; Н.М. Сіренко, д.е.н., проф.; О.І. Котикова, д.е.н., проф.; Джулія Олбрайт, PhD, проф. (США); І.В. Гончаренко, д.е.н., проф.; О.М. Вишневська, д.е.н., доц.; А.В. Ключник, д.е.н., доц.; О.Є. Новіков, д.е.н., доц.; О.В. Скрипнюк, д.ю.н., проф.; О.Д. Гудзинський, д.е.н., проф.; О.Ю. Єрмаков, д.е.н., проф.; В.І. Топіха, д.е.н., проф.; В.М. Яценко, д.е.н., проф.; М.П. Сахацький, д.е.н., проф.; В.С. Дога, д.е.н., проф. (Молдова).

Технічні науки: Б.І. Бутаков, д.т.н., проф.; К.В. Дубовенко, д.т.н., проф.; В.І. Гавриш, д.е.н., проф.; В.Д. Будаков, д.т.н., проф.; С.І. Пастушенко, д.т.н., проф.; А.А. Ставинський, д.т.н., проф.; В.П. Лялякіна, д.т.н., проф. (Росія).

Сільськогосподарські науки: В.С. Топіха, д.с.-г.н., проф.; Т.В. Підпала, д.с.-г.н., проф.; Л.С. Патрева, д.с.-г.н., проф.; В.П. Рибалко, д.с.-г.н., проф., академік НААН України; І.Ю. Горбатенко, д.б.н., проф.; І.М. Рожков, д.б.н., проф.; В.А. Захаров, д.с.-г.н., проф. (Росія); С.Г. Чорний, д.с.-г.н., проф.; М.О. Самойленко, д.с.-г.н., проф.; Л.К. Антипова, д.с.-г.н., доц.; В.І. Січкарь, д.б.н., проф.; А.О. Лимар, д.с.-г.н., проф.; А.П. Орлюк, д.б.н., проф.; В.Я. Щербаков, д.с.-г.н., проф.; Майкл Бьоме, проф. (Німеччина).

Рекомендовано до друку вченою радою Миколаївського національного аграрного університету. Протокол № 2 від 29.10.13 р.

Посилання на видання обов'язкові.

Точка зору редколегії не завжди збігається з позицією авторів.

Адреса редакції, видавця та виготовлювача:

54020, Миколаїв, вул. Паризької комуни, 9,

Миколаївський національний аграрний університет,

тел. 0 (512) 58-05-95, www.mnau.edu.ua, e-mail: visnik@mnau.edu.ua

© Миколаївський національний аграрний університет, 2013

МЕТОДИ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ В ДЕТЕКЦІЇ ТА ТИПУВАННІ ПАТОГЕННИХ ВІРУСІВ ТА БАКТЕРІЙ

*І.Ю. Горбатенко, доктор біологічних наук, професор, дійсний член
Нью-Йоркської академії наук
Миколаївський національний аграрний університет*

*Представлено сучасні методи діагностики патогенів, що викорис-
товуються у медичній біотехнології та молекулярній біології. Особли-
ва увага приділяється методу генотипування, що в наш час отримав
найбільше застосування у практиці.*

Ключові слова: методи, молекули, біологія, патогени, плазміди.

Вступ. У діагностиці патогенів у ветеринарній медицині використовують методи молекулярної біології, такі як прямий імуноферментний аналіз, непрямий імуноферментний аналіз, реакція імунодифузії в агарі та полімеразно-ланцюгова реакція.

Історично склалося, що одним з перших факторів визначення видів патогенів (бактерій) став нуклеотидний склад ДНК. Тому генотипування (ДНК-типування) – це процес діагностики геному організму (геномна ДНК). Молекулярні методи діагностики стали використовувати у середині минулого сторіччя, коли Meyers та інші стали використовувати для наявності аналізу плазмід за допомогою електрофорезу в агарозному гелі.

У 1984 р. Schwartz, Cantor запропонували метод гелелектрофорезу у пульсуючому полі, що базувався на розділенні значних фрагментів ДНК (10-800 тис. пар нуклеотидів). Цей метод широко використовується у молекулярній епідеміології, завдяки відтворюваності результатів та високій дискримінуючій потужності для диференціації та типування великої кількості різних штамів патогенів (грам-негативні, грам-позитивні бактерії а також гриби). Цей метод дає змогу аналізувати близько 90% бактеріальної хромосоми, що дало цьому методу право вважатися стандартним. Цей метод дав можливість

розглядати ізоляти бактерій з однаковими рестрикційними паттернами як нерозрізнені. Ізоляти, які відрізняються на 3 та менше позицій рестрикційних фрагментів, вважаються близько родинними, а ізоляти, які відрізняються на 4-6 позицій рестрикційних фрагментів, розглядаються як можливо родинні. В інших випадках – ізоляти неспоріднені. Цей метод є складним внаслідок тривалості аналізу (5-6 днів), значних витрат як матеріальних статків, так і фізичних.

Плазмідний аналіз. Плазміди – це невеликі кільцеві молекули ДНК, які є автономними і характеризуються резистентністю до антибіотиків та визначають фактор вірулентності бактерій. У 1986 р. Schaberg, Zervos використали плазмідний аналіз (перший молекулярний метод для типування грам-позитивних та грам-негативних бактерій). При цьому значення мали кількість і розмір плазмід. В епідеміології цей метод дає змогу розрізнявати ендемічні та епідемічні штами, а також є фактором при визначенні стійкості до антибіотиків. Недоліком цього методу є те, що він є інформативним, при цьому є можливість існування різних профілів.

Метод поліморфізму довжини рестрикційних фрагментів. Цей метод базується на визначенні набору смуг різної довжини для неспоріднених бактеріальних штамів, використовується для їх диференціації. При використанні з полімеразно-ланцюговою реакцією (ПАР) з ген-специфічними праймерами метод поліморфізму довжини рестрикційних ферментів надає можливість генотипування патогенних мікроорганізмів за допомогою визначення специфічних локусів ДНК, визначення вірулентності штамів, а також локального розповсюдження різних генотипів конкретного патогена. Недоліком цього методу є його дискримінуюча потужність, що дає перевагу іншим методам, таким як риботипування та ампліфікація ДНК з випадковими праймерами.

Риботипування. У 1989 р. Т. Чеку та С. Олтмену було вручено Нобелівську премію за відкриття ферментної активності рибонуклеїнових кислот (рибозимів). Медичні та біологічні дослідження рибозимів і антисмислових РНК (асРНК) виявили ефективність їх використання для інгібування репродук-

ції патогенних вірусів. З цього погляду ці комплекси адресних рибополінуклеотидів являють собою потенційно могутній інструмент у медичній і ветеринарній практиці, тому що можуть бути використані в генетичній терапії, а також дають реальну можливість для створення порід трансгенних тварин, стійких до декількох вірусних інфекцій.

Метод риботипування – різновид саузерн-блотингу, у якому фрагменти ДНК гібридизуються з оперонами рибосомальної ДНК, що кодує гени 16S та/або 23S рРНК та мають висококонсервативні послідовності. В зв'язку з тим, що кількість цих послідовностей у різних видів бактерій змінюється, це дає можливість ідентифікації епідемічних штамів, їх ідентифікації та диференціювання у зв'язку з великим числом оперонів. Недоліком цього методу є те, що дискримінуючи потужність рибосомів незначна для типування бактерій з обмеженою кількістю оперонів (мікобактерії або ентерококи). Для більш широкого застосування цього методу обмеженням є відсутність колекції стандартизованих типових штамів.

Секвенування. Цей метод був розроблений у 70-х рр. минулого сторіччя для визначення нуклеотидної послідовності ДНК. Sanger, Coulson у 1975 р. запропонували метод прямого ферментного секвенування. У 1977 р. Maxam, Gilbert для секвенування запропонували специфічну хімічну деградацію фрагмента. В наш час секвенування відбувається автоматизовано, що залежить від типу секвенатора та методу і дозволяє визначати послідовності довжиною від 400 до 1000 і більше нуклеотидів, що значно менше у порівнянні з довжиною хромосомної ДНК. Для типування мікроорганізмів та розділення штамів шляхом секвенування ідентифікують варіабельний фрагмент геномної ДНК, який не передається горизонтально до інших штамів. Наприклад короткі охарактеризовані фрагменти ДНК вірусів, які використовуються для їхнього типування. У бактерій секвенування, крім типування, дає можливість виявити мутацію в генах, що пов'язані зі стійкістю до ліків. У зв'язку з високою дискримінуючою здатністю та відтворюваністю цей метод є перспективним для вивчення організмів,

які не культивуються з невизначеними фенотиповими ознаками. Недоліком цього методу є значна матеріальна вартість.

Метод ампліфікації поліморфної ДНК із застосуванням випадкових праймерів.

Williams у 1990 р. запропонував використання цього методу для генотипування бактерій та проведення цілеспрямованих епідеміологічних досліджень штамів патогенів, що культивуються на штучних живильних середовищах. Метод базується на застосуванні ампліфікації випадкових фрагментів геному в умовах не суворого зв'язування емпірично визначених праймерів (олігонуклеотиди довжиною 10-15 нуклеотидів) з ДНК мішенню за низької температури. Недоліком цього методу є ймовірність отримання неістотних результатів, що заперечує використання його як стандартного методу.

Поліморфізм довжини ампліфікаційних фрагментів.

Спочатку цей метод використовувався для ідентифікації геномів рослин, потім його стали використовувати і для типування бактерій. Метод базується на проведенні вибіркової ампліфікації фрагментів, отриманих після обробки екстрагованої та очищеної бактеріальної ДНК ферментами рестрикції та лінійованих з олігонуклеотидами – лінкерами, що містять сайт-рестрикції, з використанням комплементарних їх праймерів, які мітяться при використанні флуоресцентної та радіоактивної мітки для подальшої візуалізації отриманих паттернів рестрикції. В практичних умовах можлива візуалізація за допомогою гел-електрофорезу. Порівняно з іншими методами генотипування, цей метод є об'єктивним у визначенні диференціації штамів з можливістю швидкого отримання відтворюваного результату.

Поліморфізм конформації одноланцюгової ДНК.

У 1989 р. Orita, Iwahama та ін. запропонували метод аналізу конфірмативної одноланцюгової ДНК для визначення на різній електрофоретичній рухливості невеликих одноланцюгових фрагментів ДНК, з однаковою їх довжиною, але різною конформацією внаслідок нуклеотидної заміни. У зв'язку з тим, що цей метод є простим та має незначну вартість, його широ-

ко застосовують для ідентифікації штамів бактерій, генотипування тварин та ін.

Полімеразно-ланцюгова реакція.

Успіхи, досягнуті за останні роки сучасною біологічною медициною та ветеринарією, привели до створення нового методу дослідження в молекулярній біології гена – полімеразно-ланцюгової реакції (ПЛР). Метод ПЛР, за відкриття якого у 1993 р. К. Mullis була присуджена Нобелівська премія з хімії, корінним чином змінив молекулярну генетику та біологію. Головна ідея ПЛР полягає в ідентифікації специфічного фрагменту молекули ДНК з наступним багатократним (105- 108 разів) його копіюванням за допомогою термостабільної ДНК-полімерази та праймерів, фланкуючих ділянку ДНК.

Досягненню максимально високих результатів дослідження сприяє оптимальний вибір «конфігурації» ПЛР-аналізу. Нами подано оптимальний варіант ПЛР – аналізу, що розрахований на звичайне обладнання без використання ферментів рестрикції, гібридизації зі специфічними зондами та флуоресцентно мічених праймерів, оскільки це призведе до ускладнення аналізу та підвищення його собівартості.

Висновок. Порівняння методів генотипування показали, що існуючі технології ДНК на основі молекулярно-генетичних методів з різними форматами ПЛР в більшості випадків мають високу точність, швидкість і надійність в порівнянні з існуючими фенотиповими методами виявлення і диференціації патогенів.

Список використаних джерел:

1. Горбатенко І. Ю. ДНК аналіз у криміналістиці / І. Ю. Горбатенко. — Херсон : Видавець Чуєв С.М., 2007. С. 123.
2. Горбатенко І. Ю. Перспективність застосування рибози мів у епідеміології вірусних хвороб у процесі використання модифікованих організмів / І. Ю. Горбатенко, К. В. Шамраєв, М. І. Гиль // Матеріали науково-практичного семінару «Проблеми отримання та використання генетично модифікованих і клонованих організмів» 11 березня 2004р. — 2004. — С. 62 — 64.
3. Горбатенко І. Ю. Особливості молекулярних технологій в детекції та типуванні патогенних бактерій та вірусів / І. Ю. Горбатенко // Причорноморська регіональна науково-практична конференція професорсько-викладацького складу. — Миколаїв, 2011.
4. Детекция вируса лейкоза КРС с использованием полимеразно-цепной реакции / О. Ю. Лиманская, А. П. Лиманский и др. // Вісник аграрної науки. — 1999. — № 9. — С. 35 — 39.

5. D. C Schwartz, C. R. Cantor // Cell. — 1984. — Vol. 37, № 1. — P. 67 — 75.
6. D. R. Schaberg , M. Zervos // Rev. Infect. Dis. — 1986. — Vol 8, № 5. — P. 705 — 712.
7. F. Sanger, A. R. Coulson//J. Mol. Biol. — 1975. — Vol. 94, № 3. — P. 441 — 448.
8. A. M. Maxam, W. Gilbert// Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1977. — Vol. 74, №2. — P. 560 — 564.
9. J. G. Williams [et. al] // Nucleic Acids Res. — 1990. — Vol. 18, № 22. — 6531 — 6535.
10. M. Orita, H. Iwahana, H. Kazanawa, T. Sekya // Proc. Natl. Acad. Sci. — 1989. Vol. 86, № 8. — P. 2766 — 2770.
11. Mullis. K. // Methods of enzymology / K. Mullis., F. Faloona // Academic Press. — 1987. — Vol. 155, — P. 335 — 350.

И.Ю. Горбатенко. Методы молекулярной биологии в детекции и типировании патогенных вирусов и бактерий.

Представлены современные методы диагностики патогенов, которые используются в медицинской биотехнологии и молекулярной биологии. Особенное внимание уделяется методу генотипирования, который в наше время наиболее применяется на практике.

I. Gorbatenko. Molecular biology techniques in the detection and typing of pathogenic viruses and bacterias.

The modern methods of diagnosis of pathogens used in medical biotechnology and molecular biology are submitted. Particular attention is given to the method of genotyping that nowadays getting used in practice most frequently.

ЗМІСТ

ЕКОНОМІЧНІ НАУКИ

В.С. Шибанін, О.І. Котикова, Ю.А. Кормишкін.

Сільськогосподарські обслуговуючі кооперативи – інструмент розвитку сільських територій3

О.В. Шибаніна, Р.В. Данильченко, Т.М. Борисова.

Удосконалення механізму експортно-імпортних операцій аграрних підприємств Миколаївської області з країнами СНД12

О.М. Вишневська. Напрями і складові вдосконалення методики оцінки зовнішнього середовища економічної системи.19

Н.М. Сіренко, Р.Є. Нікітіна. Сучасний стан садівництва та логістика реалізаційної діяльності садівничих підприємств Миколаївської області.....29

В.П. Ключан, Н.І. Костаневич, А.Г. Костирко.

Оцінка існуючих моделей і застосування методу „ККК” для діагностики банкрутства37

Г.М. Рябенко. Стан та перспективи розвитку регіонального ринку агрострахування.....43

Т.І. Лункіна. державне фінансування соціального розвитку населення в Україні.....49

В.М. Метелиця. Об'єкти бухгалтерської професії в аграрному секторі.54

О.Ф. Кирилюк. Державне регулювання якості і безпечності продукції птахівництва в умовах глобалізації продовольчих ринків61

В.А. Ткачук. Розвиток соціальної інфраструктури сільських територій України в контексті їх сталого розвитку.69

І.Ю. Кочетова. Трансформаційне підґрунтя успішного функціонування підприємства на ринку.....81

Г.В. Токарчук. Інтегральний метод оцінки інноваційної складової туристичного потенціалу регіону.88

М.С. Гордієнко. Зарубіжний досвід підтримки розвитку сільськогосподарської обслуговуючої кооперації в контексті регіонального економічного розвитку.....97

О.С. Тупчий. Методичні основи дослідження економічної ефективності виробництва продукції садівництва..... 106

СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКІ НАУКИ

С.Г. Чорний, О.В. Письменний, О.С. Левкова. Вивчення впливу мікродобрив (triamin radicular, granfol k та quicelum) на урожайність та якість капусти білокачанної..... 111

С.Г. Хаблак, Я.А. Абдуллаєва. Расовий склад вовчка (orobanche cumana wallr.) в посівах соняшнику в умовах північного Степу України. 116

Р.І. Беспалько, С.Ю. Хрищук. Стан використання ГІС для потреб сільського господарства..... 122

Л.В. Иванова-Ханина. Влияние гормонального состава питательной среды на интенсивность роста малины в культуре in vitro. 128

О.В. Видинієвська. Вплив технології No-till на вміст поживних елементів в чорноземі південному. 136

О.Л. Семенченко, А.С. Даніліна. Ефективність застосування біоглобіну на посівах буряка столового у повторній культурі на зрошенні дощуванням в умовах північного Степу України. 144

О.О. Гаврюшенко. Обґрунтування динаміки щільності складання моделей техноземів при сільськогосподарському освоєнні в умовах Нікопольського марганцеворудного басейну. 149

І.П. Сатановська. Оцінка моделей технологій вирощування кукурудзи на силос середньостиглого гібрида Моніка 350 МВ. .. 155

О.Т. Бусенко. Функція гіпофіза, наднирників і сім'яників у бичків за зниженого рівня згодовування молока. 162

А.В. Гуцол. Перетравність поживних речовин раціону і баланс азоту у свиней при згодовуванні ферментних препаратів..... 168

І.Ю. Горбатенко. Методи молекулярної біології в детекції та типуванні патогенних вірусів та бактерій 174

ТЕХНІЧНІ НАУКИ

В.С. Шибанін, Л.П. Шибаніна, В.Г. Богза. Розрахунок сталевих каркасів з універсальних елементів змінного перерізу з гнучкою стінкою 180

С.М. Анастасенко, В.А. Гайворонський. Аналіз параметрів системи сервоприводу модернізованої газорізальної машини....	186
Л.І. Бугрім, І.С. Білюк, О.С. Кириченко. Підвищення ефективності електропривода стенда для налагодження паливорегулюючої апаратури.....	193
І.С. Швець, В.Г. Жекул, С.Г. Поклонов, О.П. Смірнов, Ю.І. Мельхер, В.В. Литвинов, С.В. Конотов, О.В. Хвоцан, Є.І. Залого. Електророзрядний спосіб відновлення продуктивності артезіанських свердловин	201

Наукове видання

Вісник аграрної науки Причорномор'я
Випуск 3(73) – 2013

Технічний редактор: *О.М. Кушнарьова.*
Комп'ютерна верстка: *М.Г. Алексєєв.*

Підписано до друку 29.10.2013. Формат 60 x 84 1/16.
Папір друк. Друк офсетний. Ум.друк.арк. 13,2.
Тираж 300 прим. Зам. № ____ . Ціна договірна.

Надруковано у видавничому відділі
Миколаївського національного аграрного університету
54020, м.Миколаїв, вул.Паризької комуни, 9

Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 4490 від 20.02.2013 р.