



Abdurauf YUSUBAXMEDOV,
O'zbekiston Milliy universiteti, PhD
E-mail: abdurauf2408@mail.ru

O'zMU professori, b.f.d. A.Vaxabov taqrizi asosida

KARTOSHKA M VIRUSINI REAL VAQTDAGI TT-PZR USULIDA TASHXISLASH UCHUN PRAYMERLAR DIZAYIN QILISH

Аннотация

Mazkur tadqiqotda kartoshkaning M virusini real vaqtdagi PZR usulida aniqlash uchun mualliflik primerlari ishlab chiqildi va ularning samaradorligi Sintol (Rossiya) kompaniyasining "Kartoshka M virusini real vaqtdagi PZR tashxislash test to'plami" bilan qiyoslandi. Bir xil namunalarda parallel ravishda o'tkazilgan tahlillar natijasida mualliflik primerlari yordamida olingan xulosalar Sintol kompaniyasi test to'plamidan olingan natijalarga to'liq mos kelishi va sezgirlik bo'yicha ulardan qolishmasligi aniqlandi.

Kalit so'zlar: KMV, TT-PZR, RNK, DNK, kDNK, praymer, kartoshka, virus, tashxis.

ДИЗАЙН ПРАЙМЕРОВ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ВИРУСА М КАРТОФЕЛЯ МЕТОДОМ ОТ-ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

Аннотация

В данном исследовании были разработаны авторские праймеры для выявления вируса М картофеля методом ПЦР в реальном времени и проведено их сравнение с диагностическим тест-набором «ПЦР в реальном времени для выявления вируса М картофеля» компании Sintol (Россия). Параллельные исследования на идентичных образцах показали, что результаты, полученные с использованием авторских праймеров, полностью соответствуют результатам тест-набора компании Sintol и не уступают им по чувствительности.

Ключевые слова: ВМК, ОТ-ПЦР, РНК, ДНК, кДНК, праймер, картофель, вирус, диагностика.

DESIGN OF PRIMERS FOR THE REAL-TIME RT-PCR DETECTION OF POTATO VIRUS M

Annotation

In this study, author-designed primers were developed for the detection of Potato virus M (PVM) using real-time PCR, and their performance was compared with the "Potato virus M Real-Time PCR Diagnostic Kit" produced by SINTOL (Russia). Comparative analyses performed on the same samples demonstrated that the results obtained with the author-designed primers were consistent with those of the commercial SINTOL kit and showed comparable sensitivity.

Key words: PVM, RT-PCR, RNA, DNA, cDNA, primer, potato, virus, diagnostics.

Kirish. Mamlakatimizda ko'plab sohalar qatori qishloq xo'jaligini rivojlantirish, zamonaviy ilm-fan yutuqlaridan foydalanish, kartoshka yetishtirish, hosildorligi va kasallik qo'zg'atuvchi patogen mikroorganizmlarni aniqlash va ularni tarqalishini oldini olishga qaratilgan diagnostika usullarini ishlab chiqish va amaliyotga joriy etish borasida muhim natijalarga erishildi. O'zbekiston Respublikasi Prezidentining 2022 yil 28 yanvardagi PF-60-son "2022-2026 yillarga mo'ljallangan Yangi O'zbekistonning taraqqiyot strategiyasi to'g'risida"gi Farmonida "mahalliy tuproq-iqlim va ekologik sharoitlariga moslashgan, kasalliklarga chidamli qishloq xo'jalik ekinlarining yangi seleksion navlarini yaratish va joriy etish" kabi muhim vazifalar belgilab berilgan. Ushbu vazifalardan kelib chiqqan holda kartoshka M virusi oqsil qobig'i gen fragmenti asosida mualliflik praymer dizayin qilish va virusni molekular-genetik identifikatsiya qilishda foydalanish orqali, fitopatogenlarning diagnostikasi, saqlanishi va sirkulyatsiyasi kabi muhim sanalgan ma'lumotlarni o'rganib, qarshi kurashish choralarni ishlab chiqishga erishish mumkin. Shuning uchun ham ushbu tadqiqot ishida KMVning molekulyar identifikatsiya qilish asosiy maqsad qilib olindi.

Adabiyotlar sharhi. PZR – molekulyar biologiyaning eksperimental usuli bo'lib, biologik namunada ma'lum nuklein kislot fragmentlarining (DNK/RNK) past konsentratsiyasini sezilarli darajada oshirishga imkon beradi. PZR sinov materialida har qanday organizmning genetik ma'lumotlarining kichik qismini aniqlay oladi [5].

PZRning ochilishi molekulyar biologik texnologiyalarning rivojlanishi bilan birga bo'ldi. 1985-yilda V.Cary *in vitro* sharoitida oldindan tanlangan DNK ning amplifikatsiya usulini taklif qildi [6]. Bu usul "polimeraza zanjir reaksiyasi" (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) usuli bo'lib, bu usulida DNK ning ma'lum bir qismini tanlab, bir necha soat ichida millionlab marta amplifikatsiya qilish imkonini beradi. Bu usulning o'ziga xosligi sintetik oligonukleotid praymerlari maqsadli nukleotidlar ketma-ketligini amplifikatsiya qilib beradi. PZR usuli yordamida fitopatogeni juda oz miqdorda ham aniqlash mumkin. [5]. Tajriba uchun material sifatida DNK yoki RNK molekulalaridan foydalaniladi. Genetik axborotning tashuvchisi sifatida juda ko'p fitoviruslar sanaladi [4]. PZR tahlillarni amalga oshirishda obekt sifatida DNKdan foydalaniladi. Shu boisdan RNK saqlovchi viruslar teskari transkripsiya jarayonida, revertaza ferment orqali DNK (kDNK) hosil qilib olinadi. Nazariy jihatdan, PZR sezgirligi tahlil qilinayotgan namunadagi istalgan obyektning bir molekula nuklein kislotasini aniqlash imkonini beradi. Shubhasiz, NK ning kerakli fragmentini amplifikatsiya qilish, ushbu jarayonga zarur praymerlarni sintez qilish uchun nukleotid ketma-ketligi haqida kamida minimal ma'lumotga ega bo'lish kerak. Ikki xil praymerdan foydalanish reaksiyaning o'ziga xos sezgirlik darajasini oshiradi [2].

Yangi sintezlangan DNK molekulalarining har biri boshqa praymer yordamida qo'shimcha DNKni sintez qilish uchun matritsa bo'lib xizmat qiladi. Buning uchun faqat reaksiyaning birinchi bosqichi natijasida hosil bo'lgan DNK molekulalarini denaturatsiya qilish, praymerlarga DNK ga qo'shimcha ravishda qo'shilish va elongatsiyani amalga oshirish imkonini beradi [7]. Ushbu 3 operatsiya PZR siklini tashkil qiladi va namunadagi DNK miqdorini ikki barobar ko'paytirishga olib keladi. Shuni ta'kidlash kerakki, yangi sintezlangan DNK zanjirlarining har biri amplifikatsiya uchun tanlangan yangi DNK molekulalarini sintez qilish uchun matritsa bo'lib xizmat qiladi. Shuning uchun, PZR DNK molekulalarining praymerlari tomonidan DNK sonini ko'rsatkichli o'sishiga olib keladi. Nazariy jihatdan, PZR ning yigirmanchi sikllariga kelib, ma'lum bir fragmentni 20 marta, ya'ni taxminan bir million marta ko'paytirish mumkin [4].

PZRning amaliy tomoni juda oddiy ko'rinadi. Probirkada DNK, praymer, dezoksiribonukleozid uchfosfatlar, bufer va DNK polimeraza aralashiriladi. Reaksiya aralashma haroratining siklik o'zgarishi: denaturatsiya (94°C) - praymer gibridlanishi (odatda 40-60°C) - elongatsiya (72°C) PZR oqimini ta'minlaydi. PZR texnologiyasi ishlab chiqilishi mikroorganizmlar haqidagi genetik ma'lumotlarni olish imkonini berdi. Ushbu molekulyar usul IFT usulidan 103 baravar yuqori sezuvchanlik ega bo'lish bilan birga DNKning aniq bir bo'lagini tez va ishonchli tarzda ko'paytirish imkonini beradi [4].

Viruslarni identifikatsiyalashda yoki ekin maydonlarining fitosanitar holatini monitoringini amalga oshirishda PZR usuli muhim ahamiyatga ega. Shuningdek kartoshkaning virussiz ekish materialini saralashda PZR diagnostikani amalda qo'llash orqali, o'simlikning vegetatsiya davrida kam fitopatogenlar bilan zararlantirishga olib keladi. Natijada esa ko'p va sifatli hosil olinishga zamin bo'ladi.

Teskari transkriptazali - PZR usuli, molekulyar biologiyada odatda TT-PZR (*RT-PCR ing. reverse transcription polymerase chain reaction*) deb ataladi. TT-PZR - bu ribonuklein kislotaning (RNK) ma'lum bir fragmentini ko'paytirish (amplifikatsiya) usulidir [5].

Bir zanjirli RNK molekulasini ferment, erkin nukleotidlar va katalizatorlar ishtirokida teskari transkripsiya jarayoni sodir bo'lib, komplementar DNK (kDNK) ga aylanadi va keyin an'anaviy PZR yordamida DNK molekulasini ko'paytiriladi.

RNK molekulasidagi nukleotidlar ketma-ketligidan komplementar DNKga aylantirish uchun revertaza fermenti ishlatiladi. Bunda mRNK shablonidan foydalanib, teskari transkriptaza fermenti va dNTPlar ishtirokida komplementar DNK (kDNK) hosil qilinadi. Reaksiya komponentari bo'lgan DNK praymerlari va teskari transkriptaza buferi bilan aralashtirilib, bir soat davomida 37 °C da inkubatsiyalash orqali amalga oshiriladi [5].

Teskari transkripsiya jarayoni ya'ni mRNA shablonidan kDNK hosil bo'lgach, keyingi bosqich standart PZR texnikasi yordamida amplifikatsiya amalga oshiriladi. 30 ta amplifikatsiya tsiklidan so'ng, kerakli DNK ketma-ketlikning millionlab nusxalari ko'paytiriladi.

TT-PZR – RNK molekulasini aniqlashda foydalaniladi. Bunga misol qilib, o'simliklarda infeksiyon kasallik keltirib chiqaruvchi, RNK saqlovchi viruslarni tashxislashni keltirish mumkin. KMV aynan RNK saqlovchi virus bo'lib, o'simlik tanasidan bu virusni TT-PZR usulida aniqlashda mRNA dan revertaza ferment yordamida kDNK hosil qilish orqali aniqlanadi [3].

Real vaqtda PZR usuli (real-time PCR, qPCR) PZR usuli printsipligiga asoslangan usuldir. Bu usul namunadagi DNK mavjudligini, shuningdek, real vaqtda uning miqdoriy tahlilini amalga oshiriladi.

Haqiqiy vaqtdagi PZR usuli an'anaviy PZRga o'xshaydi, ammo reaksiyaga floresent zondlar yoki interporlovchi bo'yoq orqali DNK aniqlanadi. DNK miqdorini aniqlashda nur ta'sirida porlash yoki rang berish intensivligi bilan hisoblaniladi. Bu vaqtda LCD ekranda signal intensivligi nisbatan maxsus egri chiziqlari paydo bo'ladi. PZR mahsulotlarini aniqlashning ikkita usuli mavjud: nospesifik interporlovchi bo'yoqlardan foydalangan holda yoki maxsus DNK problari yordamida [3, 6].

Real vaqtda PZR usuli orqali nuklein kislotasini ko'paytirish yordamida o'simliklarda qo'ydagi sinovlarni o'tkazilishi mumkin:

- urug'lik ko'paytirishning barcha bosqichlarida birlamchi urug'chilikda fitopatogenlarni (kartoshka urug'lik tuganagida yashirin shaklda bakterial va virusli infeksiyalarni) mavjudligini aniqlashda;

- o'simlik vegetativ davrida fitopatogenlar bilan zararlantirilganligini aniqlashda;

- fitopatogen kasallik tabiiy tarqatuvchilarini aniqlashda ;

- kasallikning rezervatorlarini aniqlashda;

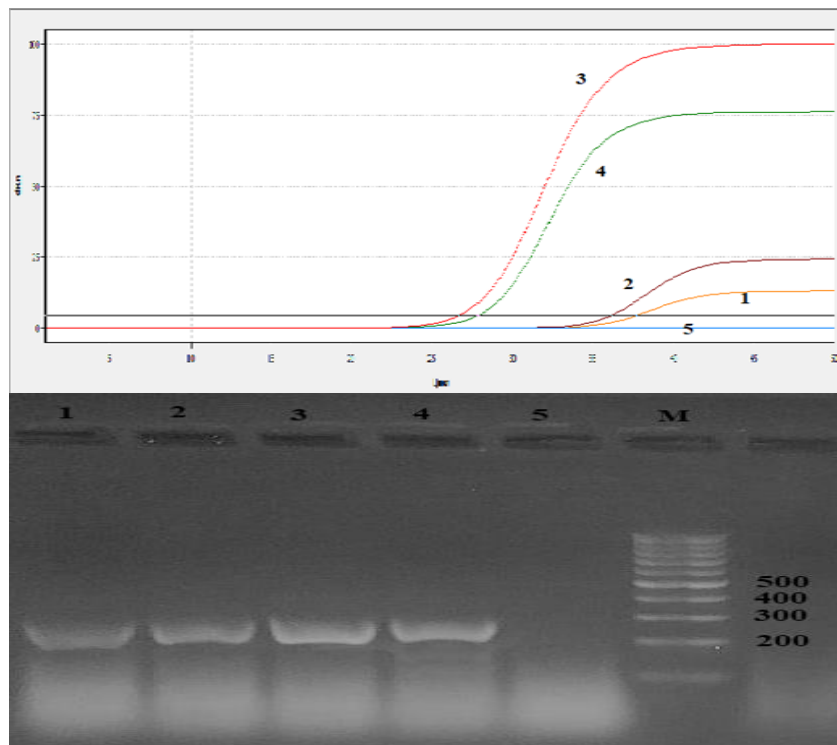
- fitopatogenlarni aniqlagich (indikator) o'simliklarni saralashda va hokazo.

Shuningdek PZR usuli orqali inson va hayvon kasallik keltirib chiqaruvchi patogenlarini, saraton hujayrasini va mikroblarini aniqlashda foydalaniladi. Real vaqt rejimidagi PZR usulida organizmning virus bilan zararlantirish darajasini, shuningdek virus shtammlarini genotipini aniqlash imkonini beradi. Suv yoki oziq-ovqat tarkibidagi ma'lum mikroorganizmlar miqdoriy va sifat ko'rsatkichlarini baholashga imkon beradi [6].

Tadqiqot metodologiyasi. PZR usuli virusli infeksiyalarni molekulyar diagnostikasida, fitopatogen turlari va shtammlarini identifikatsiya qilishda muhim ahamiyatga ega. KMV RNK tarkibli o'simlik virusi bo'lganligi uchun teskari transkriptazali-polimeraza zanjirli reaksiyasi (TT-PZR) usulidan foydalanib tashxis qo'yiladi. Real vaqtdagi TT-PZR o'tkazish uchun maxsus praymerlar dizayn qilindi. Buning uchun NCBI ma'lumotlar bazasiga kiritilgan KMV genomlarining ketma-ketligi asosida KMV ga praymer ishlab chiqildi. KMV virus aniqlash uchun universal praymerlar "alignment software" dasturidan foydalangan holda aniqlandi va praymerlar "Primer-3" dasturi yordamida ishlab chiqildi. Praymerlar KMV virusini gen bankdagi mavjud 370 ta izolyatlarini 98 % aniqlay olish imkoniyatini NCBI ma'lumotlar bazasi tomonidan taqdim etilgan Basic Local Alignment Search Tool dasturi yordamida tekshirildi [4]. Ishlab chiqilgan quyidagi mualliflik praymerlari *Forward* praymer: PVM_F5'-CTGAGCACGTGCARCAGGT-3' *Reverse* praymer: PVM_R5'-TTCTCAACGTAATCAAAGCAGTC-3' flyurosentli zond bilan belgilangan *probe* praymeri Cy5-GCAAGCAGCTCCGTATTCCTGGATC-BHQ-2 KMV ning CP geni nukleotidlar ketma-ketligiga mos qilib tanlangan. Replikaza sinteziga javobgar genning bir qismini ifodalovchi PZR mahsuloti 298 juft nukleotid (j.n.) ketma-ketligiga teng.

Tadqiqot uchun virus bilan kasallangan namunalardan umumiy RNK ajratish "Invitrogen" (ThermoFisher, AQSH) "PURELINK RNA MINI KIT" to'plami yordamida, ishlab chiqaruvchi yuriqnoma ko'rsatmalariga muvofiq amalga oshirildi.

Tadqiqot natijalari va tahlili. Tadqiqot uchun tanlangan namunalardan laboratoriya sharoitida KMVning umumiy RNKsi ajratildi va, real vaqtdagi hamda an'anaviy TT-PZR o'tkazildi. Muayyan praymerlarni alohida ishlatib, KMVni o'ziga xos CP geniga tanlab olingan praymerlari 298 j.n. segmentini amplifikatsiyaladi (1-rasm).



1-rasm. KMVni real vaqtdagi TT-PZR va standart TT-PZR usuli yordamida diagnostika taqqoslama xulosalari. Rasmdagi: 1- “Agave” navi; 2 - “Gala” navi; 3 - “Zarzara” navi; 4 - “Pikas” navi; 5 - sog‘lom kartoshka namunasi; M-1000 bp DNA ladder Plus.

O‘tkazilgan tajribada standart (an’anaviy) va real vaqtdagi PZR usullardan bir xil natijalar olindi. Ammo real vaqtdagi PZRning standart (an’anaviy) PZRdan avzallik tarafi: juda ko‘p namunalarga qisqa vaqtda tekshirish imkonini mavjud, nukleyin kislotani bo‘yash uchun foydalaniladigan etidiym bromid kabi inson salomatligiga xavfli kanserogen moddalardan foydalanilmaydi, laboratoriyani nukleyin kislotalar (amplikonlar) bilan ifloslantirish (kontaminatsiya) xavfi darajasi juda kam va eng muhimi sezgirlik darajasi yuqori, bunda tajriba natijasini olishda inson faktori ishtirok etmaydi.

Virus diagnostikasi uchun ishlab chiqilgan mualliflik praymerlarni baholash uchun qiyosiy tahlil tajribalari o‘tkazildi. Tadqiqot davomida SINTOL (Rossiya) kompaniyasining “Kartoshka M virusini real vaqtdagi PZR tashxis test to‘plami” bilan qiyosiy tahlil o‘tkazildi (1-jadval).

Ishlab chiqilgan PZR praymerlar boshqa tadqiqotlarda qo‘llanilayotgan muqobil PZR to‘plam bilan taqqoslama tajriba o‘tkazib solishtirish muhim sanaladi. Shu maqsadda “Sabzavotchilik, poliz ekinlari va kartoshkachilik ilmiy tadqiqot instituti” kolleksiyasida mavjud nav va namunalar hamda boshqa KMV bilan mexanik inokulyatsiya qilish orqali kasallantirilgan bir qator o‘simliklardan foydalangan holda solishtirish amalga oshirildi (1-jadval).

Jadvalda keltirilgan natijaga ko‘ra KMV diagnostikasi uchun ishlab chiqarilgan praymerlar va ushbu diagnostikum muqobili bo‘lgan SINTOL (Rossiya) kompaniyasining “Kartoshka M virusini real vaqtdagi-PZR tashxis test to‘plami” bilan solishtirilganda bir xil natijani, ya‘ni 35 ta namunadan 18 tasida virus bilan kasallanganligi aniqlandi. Qolgan namunalarda KMVning irsiy genetik materiali aniqlanmadi.

Solishtirish natijasida ikkala testda ham PZR natijasi (Ct) bir-biriga juda yaqin chiqqanligi, O‘zbekiston sharoitida mualliflik praymerlar yordamida PZR test to‘plamini KMV diagnostikasi uchun qo‘llash, virusni erta aniqlagan holda virus epifitotitsini oldini olishda muhim amaliy ahamiyatga ega ekanligini e‘tirof etish lozim.

1-jadval

KMV diagnostikasi uchun ishlab chiqilgan PZR tashxis test to‘plamining muqobil varianti bilan sezgirligini aniqlash bo‘yicha qiyosiy tahlili

No	Nav nomi	Ishlab chiqilgan praymerlar	SINTOL kompaniyasining “Kartoshka M virusini real vaqtdagi-PZR” tashxis test to‘plami
		PZR natijasi (Ct*)	PZR natijasi (Ct)
1	Karona	32,95	28,64
2	Bog‘izag‘on	31,42	34,22
3	Pskom	15,56	24,81
4	Quvonch	26,73	31,84
5	Toshkent ertagi	14,03	25,31
6	O‘zbekiston qili	24,71	28,67
7	Aqrob	16,69	22,74
8	Umid	29,49	24,63
9	Mastak	-	-
10	Yuliya	33,94	27,84
11	Karlan	33,48	28,64
12	Manifes	21,26	25,44
13	Uladar	27,66	25,28
14	Suravink	-	-
15	Zarochka	-	-
16	Palast	-	-
17	Liliya	-	-

18	Gorantiya	-	-
19	Universal	-	-
20	K-1	-	-
21	K-2	-	-
22	K-5	-	-
23	K-9	21,94	28,29
24	K-12	32,35	29,55
25	K-73	-	-
26	Golden	-	-
27	Ariran	-	-
28	Pitek	35,08	29,54
29	Kavkaz	34,88	33,34
30	Naxitta	35,18	29,59
31	Zirve	35,16	31,45
32	Kaya	-	-
33	Anaran	-	-
34	Yaproq	-	-
35	Bahor	-	-

Izox: *Ct (cycle threshold) - bu real vaqtdagi PZRda virus chiqqan tsiklni ko'rsatadi.

Tsikl ko'rsatgan ko'rsatgichdan boshlab sinov namunasi ijobiy hisoblanadi.

Xulosa va takliflar. Ushbu olib borilgan tadqiqotlar natijasida kartoshka urug'lik tuganaklari hamda barglaridan KMVni aniqlashda molekulyar diagnostika uchun praymerlar dizayn qilindi va virus real vaqtdagi-PZR usulida aniqlandi. Dizayn qilingan mualliflik praymerlar Sintol (Rossiya) kompaniyasidan olingan xorijiy analoglar bilan qiyosiy tahlili o'tkazilganda sezgirlik jihatdan qolishmasligini ko'rsatdi.

ADABIYOTLAR

1. Sattorov M, Sheveleva A, Fayziev V, Chirkov S (2020). First report of plum pox virus on plum in Uzbekistan. Plant Dis. 104(9): 2533.
2. Agindotan B.O., Shiel P.J., Berger P.H., Simultaneous detection of potato viruses, PLRV, PVA, PVX and PVY from dormant potato tubers by TaqMan^(R) real-time RT-PCR. J. Virol Methods. 142, 2007. pp.1-9.
3. Makhmudov T, Kadirova ZN, Adilov BS, Abdikarimov BQ, Abduvaliev BA, Ziyaev ZM, Sherimbetov AG, Kurganov S (2023). Molecular characterization of barley yellow dwarf virus (bydv) isolate t-uzb2 in Uzbekistan. Pak. J. Phytopathol. Vol 35, No 1 (2023) 127-135. DOI: <https://doi.org/10.33866/phytopathol.035.01.0875>
4. Yusubakhmedov AA, Fayziev VB, Adilov B, Makhmudov TKN, Abduvaliev BA, Kurganov SK, Bekmatova EE, Temirov AA, Erdanaeva SHP, Atabaeva DT (2024). Molecular identification of the potato virus M isolate PVM-UZ ay1 with coat protein (CP) gene and phylogenetic analysis. SABRAO J. Breed. Genet. 56(5): 1769-1777. <http://doi.org/10.54910/sabrao2024.56.5.2>.
5. Климина Е.В. Идентификация вирусов у растений картофеля методом ПЦР. Международный научный журнал «ВЕСТНИК НАУКИ» № 2 (11) Т.3 2019. 95-99 с.
6. Ребриков Д.В., Саматов Г.Ю. и др. ПЦР в реальном времени. Лаборатория знаний. М: БИНОМ 2009. 223-ст.
7. Юсубахмедов А.А., Файзиев В.Б. (2022). ОПРЕДЕЛЕНИЕ НЕКОТОРЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ М ВИРУСА КАРТОФЕЛЯ С ПОМОЩЬЮ МЕТОДА ПЦР. Современная биология и генетика, 1-2 (1), 14-20.