

Навчально-науковий центр "Інститут біології та медицини"
Кафедра вірусології

А.А. Дуніч, О.В. Шевченко, І.Г. Будзанівська

Методичні рекомендації

до спецкурсу

«ЛАБОРАТОРНИЙ ПРАКТИКУМ З ВІРУСОЛОГІЇ»

для студентів денної форми навчання 3-го курсу

ОР «Бакалавр», ОПП «Біологія»

ННЦ «Інститут біології та медицини»

Київ-2023

Методичні рекомендації до спецкурсу «Лабораторний практикум з вірусології» для студентів 3-го курсу денної форми навчання ОР «Бакалавр», ОПП «Біологія» ННЦ «Інститут біології та медицини» // Київський національний університет імені Тараса Шевченка. с Київ. – Упорядники: А.А. Дуніч, О.В. Шевченко, І.Г. Будзанівська. – 2023. – 47 с.

Рецензенти:

1. Сківка Л.М. – д.б.н., професор, завідувач кафедри мікробіології та імунології, ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка
2. Загородня С.Д. – к.б.н., старший дослідник, завідувач відділу репродукції вірусів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України

Методичні рекомендації розроблені згідно навчальної програми лабораторних занять «Лабораторного практикуму з вірусології» кафедри вірусології для студентів 3 курсу денної форми навчання ОР «Бакалавр» ОПП «Біологія» ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка.

Затверджено вченою радою ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка протокол №2 від 7 вересня 2023 р.

ЗМІСТ

ВСТУП	4
<i>Лабораторне заняття 1.</i>	
Організація вірусологічних лабораторій.....	5
<i>Лабораторне заняття 2.</i>	
Буферні розчини у вірусологічних дослідженнях та їх приготування. Відсоткова та молярна концентрація.	6
<i>Лабораторне заняття 3.</i>	
Виділення, очистка, концентрування вірусних препаратів.....	8
<i>Лабораторне заняття 4.</i>	
Визначення концентрації білка у вірусних препаратах.....	10
<i>Лабораторне заняття 5.</i>	
Визначення чистоти вірусних препаратів.....	14
<i>Лабораторне заняття 6.</i>	
Приготування препаратів вірусів для трансмісійної електронної мікроскопії методом негативного контрастування. Метод флотації.....	16
<i>Лабораторне заняття 7.</i>	
Визначення розмірів вірусів за електронно-мікроскопічними зображеннями..	18
<i>Лабораторне заняття 8.</i>	
Використання полімеразної ланцюгової реакції для детекції ДНК-вмісних вірусів.....	19
<i>Лабораторне заняття 9.</i>	
Імунізація лабораторних тварин для отримання вірусоспецифічної поліклональної антисироватки.....	23
<i>Лабораторне заняття 10.</i>	
Порівняння чутливості різних серологічних методів з візуальною оцінкою результатів.....	26
<i>Лабораторне заняття 11.</i>	
Визначення ефективності набутого противірусного імунітету з візуальною оцінкою результатів.....	30
<i>Лабораторне заняття 12.</i>	
Специфічна серодіагностика вірусних антигенів у тканинах рослин методом (імуно)флуоресцентної мікроскопії.....	35
<i>Лабораторне заняття 13.</i>	
Визначення титру вірусоспецифічної поліклональної антисироватки методом непрямого імуноферментного аналізу.....	38
<i>Лабораторне заняття 14.</i>	
Диференціальна серологічна діагностика вірусних антигенів у матеріалі методом імуноферментного аналізу у модифікації «сендвіч».....	42
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	45
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	47

ВСТУП

Під час проведення описаних лабораторних робіт студенти закріплюють практичні навички роботи з вірусами та опановують основні методи біологічних досліджень, що застосовуються у вірусології, зокрема: виділення, накопичення, очищення вірусів; визначення концентрації та чистоти вірусних препаратів; дослідження розмірів та морфології віріонів; виявлення та ідентифікацію вірусів із застосуванням сучасних серологічних, молекулярно-біологічних, електронно-мікроскопічних методів досліджень; отримання діагностичних сироваток до вірусів. Представлені методичні рекомендації є важливими для формування у студентів розуміння використання відповідних методів для досягнення поставленої мети з подальшим планування вірусологічного експерименту, застосуванням різних методів та методичних прийомів для вирішення конкретної науково-практичної задачі, статистичної обробки отриманих даних та інтерпретації результатів експерименту.

Лабораторна робота №1

ОРГАНІЗАЦІЯ ВІРУСОЛОГІЧНИХ ЛАБОРАТОРІЙ

Мета заняття: ознайомитися з порядком організації вірусологічних лабораторій та правилами роботи в них; обладнанням та інструментарієм; методами стерилізації лабораторного посуду; набуття навичок приготування лабораторного посуду для вірусологічних досліджень.

Хід роботи:

1. Ознайомитися з вірусологічною лабораторією кафедри та її основним обладнанням.
2. Вивчити санітарно-епідемічні правила роботи вірусологічної лабораторії.
3. Вивчити правила роботи з вірусомісним матеріалом.
4. Одержати інструктаж по техніці безпеки при роботі у вірусологічній лабораторії і розписатися про ознайомлення з правилами в журналі.
5. Занотувати в робочих зошитах основні типи посуду, інструментарію, приладів та обладнання, які використовуються у вірусологічній лабораторії.

Контрольні запитання:

1. Які завдання вирішуються у вірусологічній лабораторії?
2. Перерахуйте причини та джерела внутрішньолабораторного зараження персоналу вірусологічних лабораторій.
3. Яким чином і з якою метою здійснюється зонування вірусологічних лабораторій?
4. Надати характеристику базовій вірусологічній лабораторії.
5. Перерахуйте основні правила роботи в базових вірусологічних лабораторіях.
6. Які засоби індивідуального захисту існують для роботи у вірусологічних лабораторіях?

Завдання для самостійної роботи:

Дезінфекція та стерилізація. Хімічні та фізичні методи стерилізації. В чому різниця між асептикою та антисептикою? Будова автоклава.

Лабораторна робота №2

БУФЕРНІ РОЗЧИНИ У ВІРУСОЛОГІЧНИХ ДОСЛІДЖЕННЯХ ТА ЇХ ПРИГОТУВАННЯ. ВІДСОТКОВА ТА МОЛЯРНА КОНЦЕНТРАЦІЯ

Мета заняття: навчитися готувати буферні розчини та розраховувати їх молярну та відсоткову концентрацію.

Матеріальне забезпечення: лабораторний посуд, ваги, шпателі, рН-метр, дистильована вода, NaCl, KH_2PO_4 , $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$, KCl, ФВК, борна кислота, ЕДТА, Tris, 1 М HCl, 1 М NaOH, формвар, хлороформ.

Хід роботи:

I). Зробити розрахунки для приготування наступних розчинів:

1. 2 % розчин перманганату калію (KMnO_4), 250 мл
2. Буфер зразка для постановки ІФА об'ємом 30 мл на 0,1 М PBS. Складові: 2% PVP, 0,2% сухе молоко, 0,2% Tween-20.
3. Буфер відмивки на 0,1 М PBS, об'ємом 1 л для постановки ІФА. Складові: 0,2% Tween-20.
4. 0,3М розчин NaCl, 100мл
5. 0,03 М розчин Na_2HCO_3 , 700 мл
6. Буфер для виділення УВК із рослин об'ємом 1л на 0,1 М PBS, що містить 0,2 М ЕДТА (етилендіамінтетраоцтова кислота, $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$) та 0,25% бета-меркаптоетанолу ($\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$).
7. Буфер для виділення вірусу 1 л, що містить: цитрат натрію 0,5М ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) + 2% ЕДТА ($\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$) + 0,3М NaCl
8. Буфер, для екстракції вірусу 1 л, що містить: 0,5М $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times 10 \text{H}_2\text{O}$ + 0,05 М боратну кислоту (H_3BO_3) + хлороформ у співвідношенні 3:1 (V/V).
9. Буферний розчин 250 мл, що містить: 20% розчин KCl, а також CaCO_3 у співвідношенні 1:5 (m/V).

II). Приготувати розчини:

1. 0,1М фосфатно-сольовий буфер (PBS), рН 7.4, 1 л:
NaCl - 8,0г
 KH_2PO_4 - 0,2г

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ -2,8г

KCl - 0,2г

Висипати наважки солей у 1 л мірну колбу, довести дистильованою водою до 1 літра. За допомогою рН-метра перевірити рН отриманого розчину. У разі необхідності довести рН 1 М HCl до значення 7.4.

2. 2% розчин фосфорно-вольфрамової кислоти (ФВК), рН 7.4, 50 мл:

Наважити 1 г ФВК, перенести до мірної колби об'ємом 100 мл, довести дистильованою водою до 50 мл. Довести рН за допомогою 1 М NaOH.

3. 0,089 М ТВЕ буфер, 500 мл :

Борна кислота – 2,75 г

ЕДТА – 0,372 г

Tris – 5,4 г

Наважки солей перенести до мірної колби об'ємом 0,5 л, довести дистильованою водою до 1 літра.

4. 2% розчин формвару на хлороформі об'ємом 100мл (для плівок-підкладинок, що застосовуються у приготуванні препаратів вірусів для TEM):

Наважити 2 г формвару, перенести до мірної колби об'ємом 100 мл, довести хлороформом до 100 мл.

Контрольні запитання:

1. Дайте визначення поняттю розчин.
2. Дайте визначення поняттю концентрація.
3. Що таке відсоткова концентрація?
4. Як розраховується відсоткова концентрація?
5. Що таке молярна концентрація та як вона розраховується?
6. Наведіть приклади простих та складних буферних розчинів.

Завдання для самостійної роботи.

Будова та принцип роботи рН-метра.

Лабораторна робота №3

ВИДІЛЕННЯ, ОЧИСТКА, КОНЦЕНТРУВАННЯ ВІРУСНИХ ПРЕПАРАТІВ

Мета заняття: оволодіти методикою отримання вірусомісного матеріалу із хворих рослин, з подальшим очищенням та концентруванням вірусного препарату.

Матеріальне забезпечення: рослини тютюну *Nicotiana tabacum*, із симптомами ВТМ, 0.1М та 0.01 М фосфатний буферний розчин рН 7,4, ПЕГ 6000, 0.01М тріс-НСІ буфер, NaCl, цукроза, скляні коби об'ємом 300 та 500 мл, скляні стакани, штатив з пробірками, лійки, марля, центрифужні пробірки, мікропробірки типу еппендорф, піпетки на 1-5 мл, самплери, накінцівники, ступки з товкачиками, дезинфікуючий розчин, ваги, низькошвидкісна центрифуга, високошвидкісна центрифуга, магнітна мішалка.

Хід роботи:

1. Замалювати в альбом симптоми на рослинах, з яких буде отримано вірусомісний матеріал.
2. Зробити наважку рослинного матеріалу 1 г, перенести її в фарфорову ступку та додати 6 мл 0.1 М PBS (рН 7.4); гомогенізувати рослинний матеріал.
3. Відфільтрувати рослинний сік у пробірку.
4. Перенести матеріал у свою центрифужну пробірку, урівноважити з іншими пробірками.
5. Низькошвидкісне центрифугування у режимі 4 000 об/од протягом 15 хв.
6. Після завершення низько швидкісного центрифугування надосад відібрати та перенести у мікропробірку типу еппендорф, підписати та розмістити у холодильник при 4°C.
7. Інкубувати надосадову рідину на магнітній мішалці з додаванням 5% ПЕГ 6000 ("Serva", США) та 1,2% NaCl протягом 60 хв при 4 °С.
8. Після інкубації центрифугувати препарат при 10 тис об/хв протягом 15 хв.
9. У подальшому осад ресуспендувати в 0,01М калій – фосфатному буфері, рН 7,4 з подальшим ВШЩ в режимі 30 тис об/хв 1,5 год на центрифусі "Beckman", ротор SW-40.

10. Відібрати осад, який знову ресуспедували в 0,01 М калій – фосфатному буфері та провести через центрифугування на цукрозній подушці в режимі 30 тис об/хв 2,5 год на тому ж роторі.

11. Осад ресуспендувати в 0,01М тріс-НСІ буфері.

Контрольні запитання:

1. Зазначте вимоги до вірусного препарату.
2. Перерахуйте цілі виділення та очистки вірусів.
3. Назвіть вимоги до методів виділення та очистки вірусів, залежно від цілі отримання вірусного препарату.
4. Назвіть основні етапи отримання вірусного препарату.
5. Чому важливо підбирати буфер при виділенні вірусу?
6. Які є вимоги до буферного розчину, що застосовується у методиках виділення та очистки вірусів?
7. Суть етапу екстракції вірусу?
8. Які додаткові компоненти можуть входити до складу буферного розчину, який застосовується на етапі екстракції вірусу, та з якою метою?
9. Що таке етап освітлення екстракту?
10. З якою метою у отриманні вірусного препарату застосовують низькошвидкісне центрифугування?
11. У яких випадках на етапі освітлення екстракту застосовують органічні розчинники?
12. Перерахуйте основні методи концентрування вірусів.
13. На яких етапах та з якою метою застосовують ПЕГ?
14. Суть методу диференційного центрифугування.

Завдання для самостійної роботи

Порівняти методи виділення вірусів рослин та вірусів людини та тварин

Лабораторна робота №4

ВИЗНАЧЕННЯ КОНЦЕНТРАЦІЇ БІЛКА У ВІРУСНИХ ПРЕПАРАТАХ

Мета заняття: ознайомитися з методами визначення білків, опанувати методики визначення концентрації білка у препаратах вірусів різними методами та порівняти отримані результати.

Матеріальне забезпечення: бичачій сироватковий альбумін (БСА), препарати ВТМ, ВМК, УВК, МВК; Na_2CO_3 , 0.1N NaOH, $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$, 1% цитрат натрію, реактив Фоліна-Чокальтеу, 0.1 М PBS рН 7.4, фізіологічний розчин, скляні стакани об'ємом 10, 20 та 50 мл, скляні пробірки, дезінфікуючий розчин, кювети, спектрофотометр.

Хід роботи:

І). Визначення кількості білка методом Лоурі.

1. Приготувати розчини:

Розчин А – 2% розчин Na_2CO_3 в 0,1N NaOH;

Розчин В – 0,5% розчин $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ в 1% цитраті натрію;

Реактив С – готують змішуванням 1 мл розчину В та 50 мл розчину А.

2. Розвести БСА для побудови калібрувальної кривої.

А). Приготувати 5 мл маточного розчину БСА на фіз. розчині в концентрації 1мг/1мл.

Б). Промаркувати пробірки від 1 до 7. У пробірках зробити розведення БСА від 25 до 500 мкг\мл - як показано в таблиці (табл.1).

Таблиця 1. Розведення БСА на фізіологічному розчині

№ пробірки	1% БСА, мл	Фіз. розчин, мл	Кількість БСА, мкг
1	0,025	0,975	25
2	0,05	0,950	50
3	0,1	0,9	100
4	0,2	0,8	200
5	0,3	0,7	300
6	0,4	0,6	400
7	0,5	0,5	500

3. Розвести вірусні препарати: ВТМ 15 мкл в 1 мл; ВМБ 100 мкл в 1 мл

4. До 1 мл дослідного матеріалу (усі розведення БСА та дослідні вірусні препарати) додати 2,5 мл розчину С. Залишити на інкубацію протягом 10 хвилин.
5. До усіх пробірок додати по 0,25 мл реактиву Фоліна – Чокальтеу. Перемішати. Залишити на інкубацію протягом 30 хвилин.
6. Визначити оптичну густину на спектрофотометрі «СФ-46» при довжині хвилі 750 нм та записати показники до таблиці 2.

Таблиця 2. Оптична густина препаратів при довжині хвилі 750 нм

№ пробірки	Кількість білка, мкг	Оптична густина при довжині хвилі 750 нм
1	25	
2	50	
3	100	
4	200	
5	300	
6	400	
7	500	
ВТМ	-	
ВМБ	-	

7. Побудувати калібрувальну криву залежності оптичної густини від концентрації БСА

8. Визначити концентрацію білка в досліджуваних препаратах ВТМ та ВМБ по калібрувальній кривій (Сдосл). Для цього значення екстинції дослідного зразка (н-д, 1,0) екстраполювати на криву та встановити концентрацію (400 мкг/мл) (Рис.1) .

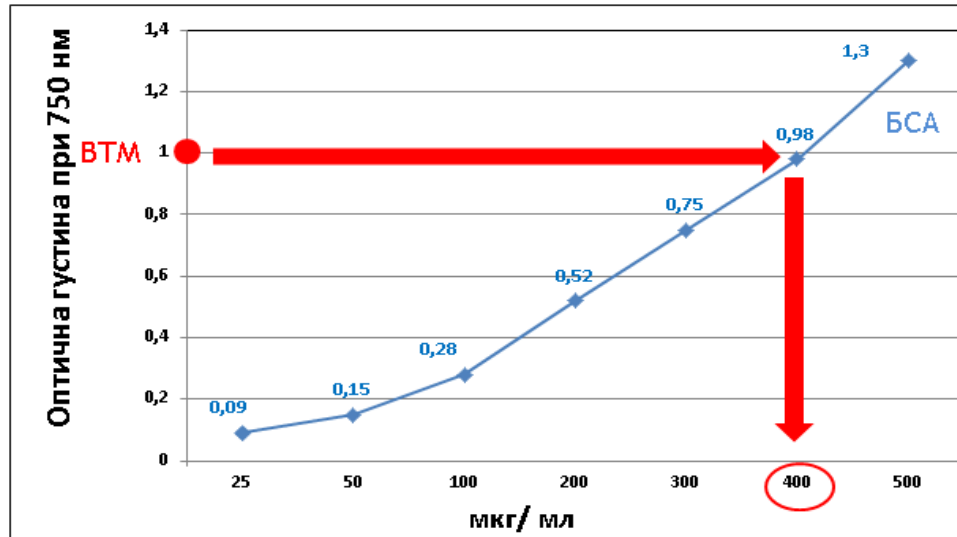


Рис.1 Визначення концентрації білка у препараті ВТМ за калібрувальною кривою, побудованою за графіком залежності концентрації БСА від оптичної густини при 750 нм

9. Визначити істинну концентрацію (Сіст) за формулою:

$$\text{Сіст (мкг/мл)} = \text{Сдосл} \times 1000 / \text{Vдосл (мкл)}, \text{ де}$$

Сдосл- концентрація, виміряна за допомогою калібрувальної кривої;

Vдосл – кількість досліджуваного препарату (мкл)

II). Визначення кількості білка методом Едельгоха.

1. Приготувати 100-кратні розведення досліджуваних вірусних препаратів на 0.1 М PBS (3 мл). Виміряти оптичне поглинання розведених препаратів на спектрофотометрі при довжині хвилі 260 нм у трьох повторностях. Дані занести до таблиці 3.

Таблиця 3. Оптична густина препаратів при довжині хвилі 260 нм

№	ВТМ	ВМБ	МВК	УВК
1				
2				
3				

2. Визначити середнє значення оптичного поглинання для кожного вірусного препарату.

3. Розрахувати концентрацію білка у вірусних препаратах за формулою:

$$C = A_{260} * N / K_e, \text{ де}$$

C - концентрація вірусу в мг/мл,

A_{260} - екстинція при довжині хвилі 260 нм,

N - розведення вірусного препарату,

K_e - коефіцієнт екстинції*

* K_e - коефіцієнт екстинції для ВТМ становить 2,7; для ВМБ - 5,1; для УВК - 1,2; для МВК - 1,22.

III. Визначення кількості білка методом Варбурга та Крістіана

1. На спектрофотометрі виміряти оптичну густину досліджуваних вірусних препаратів при довжинах хвиль при 280 нм.
2. Дані занести до таблиці 4. Розрахувати середнє значення оптичного поглинання для кожного досліджуваного вірусного препарату.

Таблиця 4. Оптична густина препаратів при довжині хвилі 280 нм

№	ВТМ	ВМБ	МВК	УВК
1				
2				
3				

3. Розрахувати концентрацію білка у препаратах за формулою:

$$C = 1,55 A_{280} - 0,76 A_{260}, \text{ де}$$

C - концентрація вірусу в мг/мл,

A_{260} - екстинція при довжині хвилі 260 нм,

A_{280} - екстинція при довжині хвилі 280 нм.

IV. Порівняти дані концентрації білка у вірусних препаратах, отримані різними методами, оформити висновок до лабораторної роботи.

Контрольні запитання:

1. На чому базуються колориметричні методи визначення білка?
2. Дайте характеристику основним методам визначення концентрації білка в біологічних рідинах.
3. Вкажіть принципи методу визначення концентрації білка за Лоурі та визначте чутливість методу.

Лабораторна робота №5

ВИЗНАЧЕННЯ ЧИСТОТИ ВІРУСНИХ ПРЕПАРАТІВ

Мета заняття: оволодіти методикою визначення чистоти вірусного препарату спектрофотометричним методом.

Матеріальне забезпечення: препарат ВТМ, кювети для спектрофотометрії, самплери, 0.1 PBS рН 7.4, спектрофотометр.

Хід роботи:

1. Суспензію очищеного вірусного препарату розвести 0.1М PBS рН=7.4 у 100 разів.
2. Зняти на спектрофотометрі показники спектру поглинання при довжинах хвиль від 240 до 300 нм, з інтервалом 5 нм та занести дані до таблиці (табл.5).

Таблиця 5. Показники поглинання вірусного препарату при довжинах хвиль 240-280 нм

Довжина хвилі, нм	240	245	250	255	260	265	270	275	280
Показник поглинання									

3. Обчислити коефіцієнт E_{260}/E_{280} та порівняти отримане значення з коефіцієнтом для чистого препарату ВТМ з літературних даних (коефіцієнт E_{260}/E_{280} ВТМ= 1,2).
4. Накреслити по отриманих показниках екстинції спектрофотометричну криву (вісь X – довжина хвилі, нм; вісь Y – значення екстинції).
5. Зробити висновок щодо чистоти вірусного препарату за коефіцієнтом E_{260}/E_{280} та спектрофотометричною кривою*.

* - інтерпретація отриманих результатів:

коефіцієнт E_{260}/E_{280} вищий за відомий – у препараті присутня стороння НК;

коефіцієнт E260/E280 нижчий за відомий – у препараті присутні сторонні домішки білка;

спектрометрична крива чистого вірусного препарату в діапазоні від 240 до 300 нм повинна мати 1 пік з максимумом поглинання при 260 нм.

Контрольні запитання:

1. У якому діапазоні необхідно проводити визначення чистоти вірусного препарату спектрофотометричним методом та чому?
2. Про що свідчить наявність на спектрофотометричній кривій у діапазоні 240-300 нм двох піків поглинання?
3. Чим можна пояснити наявність у вірусному препараті білкових домішок?

Завдання для самостійної роботи:

Спектральні методи дослідження вірусів.

Лабораторне заняття №6

ПРИГОТУВАННЯ ПРЕПАРАТІВ ВІРУСІВ ДЛЯ ТРАНСМІСІЙНОЇ ЕЛЕКТРОННОЇ МІКРОСКОПІЇ МЕТОДОМ ФЛОТАЦІЇ

Мета заняття: ознайомитися з основними методами приготування препаратів фітовірусів для трансмісійної електронної мікроскопії. Приготувати препарати вірусу методом негативного контрастування і флотації.

Матеріальне забезпечення: предметні скельця, леза, ступки з товкачиком, 0.1 М PBS рН=7,4, склянки (об'єм 20 мл), дистильована вода, 2% розчин формвару на хлороформі, спирт, мідні сіточки для електронної мікроскопії, пінцети, фільтрувальний папір, самплери (об'ємом 20-200 мкл), накінцівники для самплерів, препарати вірусів, 2% розчин ФВК рН=7,2, парафільм, ступки фарфорові, чашки Петрі.

Хід роботи:

I. Приготувати гомогенати із вірусінфікованих рослинних зразків:

1. Наважку листків перетерти у ступці із додаванням 0.1М PBS розчина у співвідношенні 1:2 (m/V).

II. Нанесення плівки-підкладинки на сіточки для електронної мікроскопії:

1. Налити у склянку 20 мл 2%-розчину формвару на хлороформі.

2. Занурити чисте предметне скельце на 2/3 його висоти у розчин формвару на 3-7 с (Рис.2.1).

3. Вийняти предметне скельце та висушити його у повітрі при кімнатній температурі. Тонку прозору плівку, що утворилася, можна виявити, якщо подихати на скельце (Рис.2.2).

4. Щоб зняти плівку, її потрібно підрізати лезом по усіх краях та занурити під кутом 45° у чисту ступку з дистильованою водою (Рис.2.3).

Після контакту з водою плівка відділиться від скельця та буде плавати на поверхні води (Рис.2.4).

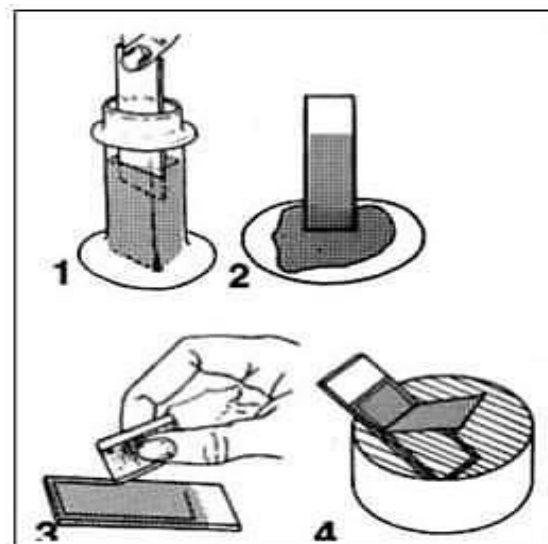


Рис. 2 Приготування формварової плівки

5. Пінцетом викласти мідні сіточки на плівку, намагаючись викладати їх щільно одна до одної.
6. Щоб зняти сітки з плівками, необхідно обережно покласти фільтрувальний папір на край плівки, після чого поступово покласти його на всю площу плівки. Після того, як уся плівка разом із сіточками прилипне до паперу обережно витягти папір з води і розмістити у чашці Петрі для висихання.

III. Приготувати препарати методом флотації:

1. Нанести на предметне скло краплю вірусомісного гомогенату.
2. За допомогою пінцета занурити сітку з плівкою-підкладкою у краплю вірусомісного матеріалу на 1-2 хв. Відібрати рідину фільтрувальним папером.
3. Поряд нанести на скельце краплю контрастера – 2% розчину ФВК.
4. Занурити сітку у краплю 2% ФВК на 2-3 хв.
5. Відібрати рідину фільтрувальним папером та викласти сітку для просушування у чашку Петрі.

Контрольні запитання:

1. Назвіть переваги та недоліки використання ЕМ у вірусологічних дослідженнях.
2. Принцип дії трансмісійного електронного мікроскопу.
3. За рахунок чого отримується зображення в електронному мікроскопі?
4. Чому необхідне контрастування вірусних препаратів?
5. У чому відмінність позитивного контрастування ЕМ препаратів вірусів від негативного?
6. Перерахуйте найбільш вживані для вірусологічних досліджень речовини, які використовуються для приготування плівок-підкладок.

Запитання для самостійної роботи:

Суть і принцип роботи скануючого електронного мікроскопа та атомно-силового мікроскопа.

Лабораторне заняття №7

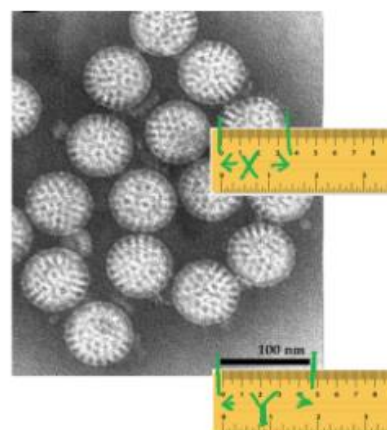
ВИЗНАЧЕННЯ РОЗМІРІВ ВІРУСІВ ЗА ЕЛЕКТРОННО-МІКРОСКОПІЧНИМИ ЗОБРАЖЕННЯМИ

Мета заняття: отримати навички визначення розмірів віріонів за електронно-мікроскопічними зображеннями.

Матеріальне забезпечення: лінійка, електронно-мікроскопічні зображення вірусів.

Хід роботи:

1. Для усіх віріонів* на мікрофотографії виміряти діаметр (для сферичних) та довжину і ширину (для нитко- і паличкоподібних за допомогою лінійки).
2. Вирахувати середнє значення отриманих величин (X) у мм.
3. Визначити значення бару в мм (B) та за допомогою лінійки довжину бару в мм (X).
4. Визначити розміри віріонів у нанометрах (S), за формулою:



$$S = Y * B / X, \text{ де}$$

Y – середнє значення отриманої величини в мм (діаметра/довжини/ширини віріонів);

B – значення бару в мм;

X – значення бару в мм.

5. Оформити висновок до лабораторної роботи із зазначенням розмірів віріонів.

* - вимірювати ті віріони, у яких видно обидва кінця частинки (для нитко-і паличкоподібних)

Контрольні запитання:

1. Чи можна за розмірами вірусних часток встановити таксономічне положення вірусу?
2. Які структури вірусів можна досліджувати за допомогою TEM?

Лабораторне заняття №8

ВИКОРИСТАННЯ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ ДЛЯ ДЕТЕКЦІЇ ДНК-ВМІСНИХ ВІРУСІВ

Мета заняття: опанувати методику постановки полімеразної ланцюгової реакції

Матеріальне забезпечення: рослинні зразки з симптомами ураження ВКП, набір для виділення ДНК Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific, США); агароза, 0,089 М TBE буфер pH=8.6, маркери ДНК, специфічні праймери до ВКП, DreamTaq™ Green PCR Master Mix (Thermo Scientific), стерильна вода, стерильні мікропробірки типу еппендорф об'ємом 1,5 мл та 0,5мл, самплери, накінцівники, низькошвидкісна центрифуга, водяна баня, фарфорові ступки з товкачиками, камера для горизонтального ЕФ, ампліфікатор.

Хід роботи:

I. Виділення тотальної ДНК із рослинного матеріалу

1. Зробити наважку рослинного матеріалу із симптомами ВКП-ураження та наважку здорових рослин (негативний контроль), кожна по 100 мг.
2. Прогомогенізувати 100 мг рослинної тканини у фарфоровій ступці з додаванням рідкого азоту.
3. Додати до ступки 400 мкл lysis solution, гомогенізація 5 хв.
4. Відібрати гомогенат зі ступки та помістити до стерильної мікропробірки типу еппендорф об'ємом 1,5 мл.
5. Розмістити мікропробірки на водяну баню – 65 °С на 10 хв.
6. Додати до кожної мікропробірки 600 мкл хлороформу, м'яко перемішати 3-5 разів.
7. Низькошвидкісне центрифугування у режимі 10 000 об/хв. протягом 2 хв.
8. Приготувати у новій чистій мікропробірці precipitation solution: 720 мкл стерильної дист. води + 80 мкл концентрованого (10 x) precipitation solution.
9. Перенести верхню водну фазу, яка містить ДНК, з мікропробірки після НШЦ (пункт 6) до мікропробірки з приготованим precipitation solution (пункт 7), перемішувати при кімнатній температурі протягом 1-2 хв.
10. Низькошвидкісне центрифугування у режимі 10 000 об/хв. протягом 2 хв.

11. Вилити супернатант, додати до цієї ж мікропробірки 100 мкл NaCl solution, ресуспендувати осад ДНК зі стінок чи дна мікропробірки.
12. Додати до мікропробірки 300 мкл холодного етанолу.
13. Екстракція ДНК ніч при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.
14. Низькошвидкісне центрифугування у режимі 10 000 об/хв. протягом 3-4 хв.
15. Відібрати етанол та додати до ДНК 20 мкл стерильної дист. води.

II. Електрофорез ДНК у агарозному гелі

1. Приготувати 1,5% агарозний гель: 300 мг агарози+20 мл TBE буферу рН 8,6.
2. Розплавити агарозу кип'ятінням 20-30 секунд. Додати краплю бромистого етидію (в концентрації 0,5 мг/мл).
3. Залити розплавлений агарозний гель у пластикову рамку та вставити гребінку так, щоб між дном лунки та низом шару гелю лишився шар агарози 0,5-1 мм.
4. У камеру для горизонтального ЕФ залити TBE буфер таким чином, щоб гель був покритий буфером мінімум на 1 см.
5. Після застигання гелю вийняти гребінку та розмістити рамку з гелем у камеру для ЕФ.
6. Внести у лунки по 5мкл ДНК+1мкл буфер зразка.
7. Закрити кришку камери, перевірити що електроди до блоку живлення підключені вірно, ввімкнути блок живлення камери, виставити необхідні налаштування (120 V, 15 хвилин) (Рис.3)

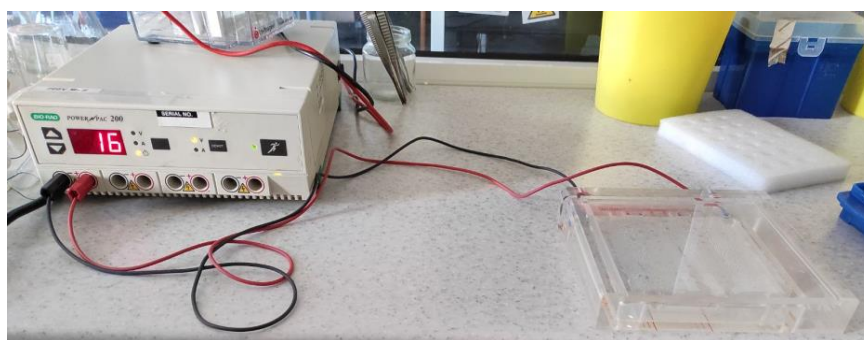


Рис. 3 Блок живлення (ліворуч) та камера (праворуч) для проведення ЕФ нуклеїнових кислот

8. Після закінчення ЕФ вимкнути блок живлення камери, відкрити кришку та вийняти з буфера гребінку з гелем.

9. Візуалізувати ДНК під УФ світлом.

III. Полімеразна ланцюгова реакція

1. Додати до нової 0,5 мкл пробірки 12,5 мкл 2х буферу Dream Taq Green PCR Master Mix, 7,5 мкл води стерильної, 1 мкл кожного з праймерів (10 μ M) та 3 мкл кДНК.
2. Розмістити пробірки в термоциклер. На ньому встановити режим ампліфікації:



95 °C – 3хв
95 °C – 30 с
60 °C – 30 с
72 °C – 1 хв
72 °C – 5 хв

} 30 циклів

IV. Електрофорез продуктів ПЛР

1. Електрофорез проводити в 1,5 % агарозному гелі, аналогічно до протоколу, наведеному у р. III. пункти 1-5.
2. Скласти та записати до лабораторного зошиту схему внесення зразків, негативного контролю та маркерів ДНК*.
3. Внести зразки, негативний контроль (7 мкл) та маркер (5 мкл) у лунки гелю.
4. Електрофорез проводять у режимі 15В/см протягом 20 хв.
5. Результати оцінювати при опроміненні гелю ультрафіолетом. Визначити розмір отриманого продукту відповідно до маркерів ДНК.

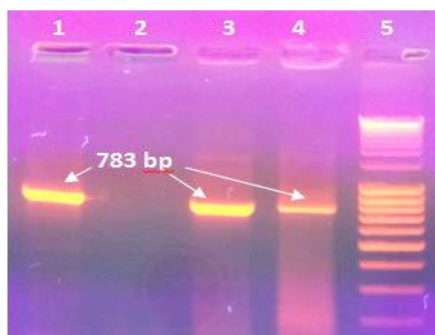


Рис. 4 Електрофореграма продуктів ПЛР із застосуванням праймерів до гена капсидного білка ВКП (розмір продукту 783 п.н.): 1, 3,4 – досліджувані зразки, 2- негативний контроль, 5 – маркери ДНК 100bp

6. Зробити висновок до лабораторної роботи щодо наявності/відсутності вірусу у досліджуваному зразку.

* - при роботі з іншими наборами для ПЛР, які не містять фарби, на цьому етапі необхідно до досліджуваних продуктів додати DNA Gel Loading Dye (6X), R0611, Thermo Fisher Scientific

Контрольні запитання:

1. Перерахуйте переваги застосування ПЛР.
2. Назвіть недоліки застосування ПЛР.
3. Перерахуйте компоненти, необхідні для проведення ПЛР.
4. Назвіть етапи в межах одного циклу ПЛР.
5. Чим регламентується температурний режим на кожному з етапів?
6. Які віруси не можна детектувати за допомогою класичної ПЛР?
7. Назвіть вимоги до праймерів, які застосовуються у ПЛР.
8. Як визначити температуру гібридизації для праймера? Від чого вона залежить?
9. З якою метою використовують ЕФ НК?
10. Що є мішенями у діагностиці вірусів за допомогою ПЛР?

Запитання для самостійної роботи

Полімерази, які застосовуються для ПЛР.

Лабораторне заняття №9

ІМУНІЗАЦІЯ ЛАБОРАТОРНИХ ТВАРИН ДЛЯ ОТРИМАННЯ ВІРУСОСПЕЦИФІЧНОЇ ПОЛКЛОНАЛЬНОЇ АНТИСИРОВАТКИ

Мета заняття: ознайомитися з методами імунізації тварин для отримання імунних сироваток і їх виснаження від гетерологічних антитіл.

Матеріальне забезпечення: вірусомісний матеріал, лабораторні тварини (пацюки, миші або кролі), хлористий натрій, гепарин, ланолін, вазелінове масло, ефір, спирт, шприци, голки, стерильні пробірки, піпетки, ступки, чашки Петрі, ножиці, пінцети, корнцанги, вата, термостат, холодильник, водяна баня, центрифуга.

Хід роботи:

1. Здійснити імунізацію лабораторних тварин вірусомісним матеріалом за такою схемою: 3-кратно субкутанним способом (разова доза вірусу на кожну тварину = 50 мкг вірусу) та 1-кратно інтравенозним способом (разова доза вірусу на кожну тварину = 120 мкг вірусу) з інтервалом в 1 тиждень. Об'єм суспензії для субкутаної імунізації = 50 мкл/точку введення. Кількість точок введення = 4 точки/тварину (внутрішня сторона кінцівок). Об'єм суспензії для інтравенозної імунізації = 150 мкл.
2. Отримати імунну сироватку через 7 днів після останнього раунду імунізації. Для цього тварина повністю наркотизується, після чого у неї береться кров серцевою пункцією або шляхом розтинання грудної клітини.
3. Поставити кров у термостат за температури 37°C на 15-30 хв, після чого обвести стерильною пастерівською піпеткою згусток крові. Дати відстоятись протягом ночі у термостаті (37°C) або одразу відцентрифугувати в режимі 1000 об/хв протягом 10 хв. Сироватку відібрати у стерильні пробірки.
4. Провести виділення глобулінової фракції сироватки крові тварини поліетиленгліколем:
 - 4.1. До певного об'єму отриманої сироватки додати рівний об'єм 20% водного розчину поліетиленгліколю (PEG- 6000).

- 4.2. Суміш центрифугувати у режимі 8000 об/хв протягом 15 хв, осад розчинити в мінімальному об'ємі 0,01М калій-фосфатного буферного розчину концентрацією, рН 7,4. Процедуру повторити двічі.
- 4.3. Виділену фракцію глобулінів діалізувати проти буферного розчину протягом ночі і спектрофотометрично визначити концентрацію імуноглобулінів. В отриманій глобуліновій фракції сироватки крові визначити титр антитіл за допомогою імуноферментного аналізу. Результати роботи занести до табл. 3.

Таблиця 6. Схема імунізації тварин

Вид тварини	Дата імунізації, спосіб введення, об'єм вірусомісного матеріалу				Дата отримання і кількість сироватки
	1	2	3	4	

Контрольні запитання:

1. Сформулюйте поняття «активність» і «специфічність» іmunних сироваток.
2. Як збільшити активність іmunних сироваток?
3. Назвіть засоби підвищення специфічності іmunних сироваток.
4. Імуноглобуліни якого класу є основним чи єдиним компонентом іmunних сироваток?

5. В чому відмінність між поліклональними та моноклональними антитілами?
6. В чому відмінність імунізації та вакцинації?
7. Що входить до поняття «імунізація з додатками» або депоновані антигени?
8. Що таке ад'ювант Фрейнда, який механізм його дії?
9. В чому відмінність між повним і неповним ад'ювантами?
10. Для чого отримують антивірусні імунні сироватки? Де їх використовують в науці і практиці?

Завдання для самостійної роботи

1. Лабораторні тварини, які застосовуються у вірусології.
2. Правила безпечної та етичної роботи з лабораторними тваринами.
3. Підбір лабораторних тварин для експерименту.
4. Тропізм вірусних інфекцій.
5. Способи маркування та ураження лабораторних тварин.
6. Схеми імунізації.
7. Ад'юванти.
8. Отримання сироватки тварин.
9. Виведення тварин з експерименту.

Лабораторне заняття №10

ПОРІВНЯННЯ ЧУТЛИВОСТІ РІЗНИХ СЕРОЛОГІЧНИХ МЕТОДІВ З ВІЗУАЛЬНОЮ ОЦІНКОЮ РЕЗУЛЬТАТІВ

Мета заняття: ознайомитися з основними серологічними методами, які базуються на явищі преципітації (преципітація в краплі, преципітація в пробірці, імунодифузія в гелі); набути практичних навичок роботи з вірусами та сироватками; оволодіти методиками постановки реакцій преципітації в краплі, преципітації в пробірці, імунодифузії за Ухтерлоні.

Матеріальне забезпечення: уражені ВТМ рослини, специфічна антивірусна сироватка, нормальна кроляча сироватка, фізіологічний розчин, 0,5М фосфатно-сольовий буфер, агар Difco, PEG-6000, азид натрію, пробірки, скельця, чашки Петрі, самплери, піпетки, термостат, холодильник.

Визначення титру антитіл в реакції преципітації в краплі

Хід роботи:

1. Приготувати витяжку з ураженої вірусом рослини. Для цього гомогенізувати рослину у ступці у стерильному 0,5М фосфатно-сольовому буфері у співвідношенні 1:2 (маса/об'єм). Центрифугувати гомогенат у режимі 5000 об/хв протягом 20 хв хв. Використовувати надосад.
2. Приготувати серійні десятикратні розведення антивірусної сироватки (5 розведень: 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000 та 1/100000) в планшетах (для першого розведення змішують 0,1 мл сироватки та 0,9 мл фізіологічного розчину, надалі розведення титрують, тобто переносять 0,1 мл до наступної лунки із 0,9 мл фізіологічного розчину).
3. На предметне скельце нанести краплю антивірусної сироватки відомого розведення та поруч краплю вірусомісної рідини.
4. Змішати краплину антивірусної сироватки з вірусомісною рідиною скляною паличкою.
5. Паралельно поставити контроль з нормальною кролячою сироваткою (з неімунізованої тварини) та вірусомісною рідиною.

6. Врахувати результати реакції через 15 хв за утворенням білуватого непрозорого осаду (преципітату). Реакція вірусовмісної рідини з нормальною сироваткою повинна бути негативною (без утворення осаду).
7. Встановити титр антивірусної сироватки за її останнім найбільшим розведенням, яке утворює осад із вірусовмісною рідиною.

Визначення титру сироватки методом кільцепреципітації

Хід роботи:

1. Внести в пробірки по 0,5 мл попередньо приготованих десятикратних розведень антивірусної сироватки.
2. Обережно по стінці пробірки нашарувати 0,5 мл вірусовмісної рідини в кожен пробірку.
3. Паралельно поставити два негативні контролі:
 - а) замість специфічної використати нормальну сироватку (НС);
 - б) замість вірусовмісної рідини використати фізіологічний розчин (ФР).
4. Облік реакції провести через 15-30 хвилин інкубації при температурі 37°C за утворенням преципітату у вигляді кільця на межі двох фаз. У випадку обох негативних контролів результати мають бути негативними (без утворення осаду).
5. Встановити титр антивірусної сироватки за її останнім найбільшим розведенням, яке утворює осад із вірусовмісною рідиною.

Визначення титру сироватки методом подвійної дифузії в гелі за Ухтерлоні

Хід роботи:

1. Приготувати 20 мл 1% агарозного гелю на 0,5М фосфатно-буферному розчині з додаванням 3% PEG-6000 та 0,1М азиду натрію. Для цього необхідну кількість агару додають в буфер, розчиняють на водяній бані (або

- в мікрохвильовій печі) до повного розчинення (розчин повинен бути прозорим). Додати необхідну кількість PEG-6000 та азиду натрію.
2. Розлити гарячий приготований агар в чашки Петрі до утворення шару в 0,3-0,5 см. Залишити на 10 хв для застигання.
 3. Зробити лунки, використовуючи пробійники та трафарет. Крайові лунки повинні знаходитися на однаковій відстані від центральної.
 4. Внести в центральну лунку антиген (вірусовмісну рідину) в кількості 10-15 мкл, в крайові лунки внести антивірусну сироватку в різних розведеннях (дво- чи десятикратних).
 5. Паралельно поставити два негативні контролі:
 - а) замість специфічної використати нормальну сироватку (НС);
 - б) замість вірусовмісної рідини використати фізіологічний розчин (ФР).
 6. Чашки закрити, помістити у вологу камеру та залишити на 3-5 діб при кімнатній температурі.
 7. Визначити титр антивірусної сироватки по лініям преципітації, що утворилися. У випадку обох негативних контролів результати мають бути негативними (без утворення осаду).
 8. Порівняти титри антивірусної сироватки, отримані різними методами. Зробити висновок про специфічність та чутливість різних серологічних методів з візуальною оцінкою результатів.

Контрольні запитання:

1. Що таке серологічні реакції?
2. Загальна характеристика серологічних методів досліджень.
3. Характеристика серологічних методів досліджень, які базуються на явищі преципітації.
4. Що таке преципітат? За рахунок чого він утворюється?
5. Для чого використовується реакція преципітації в краплині та її модифікації?

6. Визначення серологічної спорідненості вірусів методом імунодифузії за Ухтерлоні.
7. Реакція кільцепреципітації: постановка, використання, переваги та недоліки.

Завдання для самостійної роботи

1. Принципи класичних серологічних методів дослідження.
2. Поняття про антитіла, антигени та індикаторні компоненти систем візуальної оцінки результатів експерименту.
3. Порівняти специфічність та чутливість різних серологічних методів з візуальною оцінкою результатів.

Лабораторне заняття №11

ВИЗНАЧЕННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ НАБУТОГО ПРОТИВІРУСНОГО ІМУНІТЕТУ З ВІЗУАЛЬНОЮ ОЦІНКОЮ РЕЗУЛЬТАТІВ

Мета заняття: вивчити можливості застосування реакції гальмування гемаглютинації (РГГА) у вірусологічних дослідженнях; навчитися ставити серологічну реакцію гальмування (затримки) гемаглютинації; ознайомитися з основними етапами її постановки для титрування антивірусних антитіл; навчитися визначати титри антитіл у парних сироватках хворих.

Матеріальне забезпечення: вірусний антиген, парні антивірусні сироватки, діагностичні сироватки, 1% суспензія курячих еритроцитів, фізіологічний розчин, пробірки, самплери, колба плоскодонна, полістиролові круглодонні планшети для серологічних реакцій, термостат на 37°C.

Хід роботи:

Реакцію затримки гемаглютинації можна ставити як макрометодом, так і мікрометодом (об'єм компонентів по 0,25 і 0,02 мл, відповідно, залежно від об'єму лунок планшетів). Нижче наведено мікрометод цієї реакції. При використанні інших об'ємів слід дотримуватися пропорційного співвідношення компонентів.

1. Титрування антигену в реакції гемаглютинації (РГА).

- 1.1. Приготувати послідовні розведення антигену в об'ємі 0,02 мл на фізіологічному розчині з коефіцієнтом 2 (тобто, двократні розведення). Для цього в лунки одного довгого ряду планшету помістити по 0,02 мл фізіологічного розчину. У першу лунку налити 0,02 мл антигену. Послідовно з першої лунки перенести в другу, з другої - в третю (і так до кінця ряду) рівну кількість розчину антигену.
- 1.2. До всіх лунок додати по 0,02 мл 1% суспензії еритроцитів певного виду тварини (для вірусу грипу – курячих еритроцитів). В останню лунку еритроцити не додавати.

- 1.3. В окрему лунку помістити 0,02 мл фізіологічного розчину і таку саму кількість 1% суспензії еритроцитів для контролю еритроцитів на можливість спонтанної гемаглютинації.
 - 1.4. Обережно струснути планшети і залишити їх за кімнатної температури (18-24°C) на 30-60 хв до появи гемаглютинації.
 - 1.5. Провести облік результатів реакції за наявністю або відсутністю гемаглютинації та визначити титр вірусу за його розведенням. Одній гемаглютинуючій одиниці (1 ГАО) відповідає найбільше розведення вірусу, що дає чітко окреслену аглютинацію еритроцитів.
2. Визначення та перевірка правильності приготування робочої дози антигену.
- Для постановки основного дослідження РГГА використовують робоче розведення антигену, що містить від 2 до 8 ГАО (залежно від вірусу, наприклад, 2 ГАО – для вірусу віспи, кору; 4 ГАО – для вірусу грипу; 8 ГАО – для тогавірусів).
- 2.1. Для приготування робочої дози антигену (РДА), що містить 4 ГАО, антиген потрібно розвести фізіологічним розчином у відповідному співвідношенні. Наприклад, якщо титр вірусу в 1 ГАО був встановлений при розведенні вірусу 1:160, то при підготовці РДА (4 ГАО) 160 потрібно поділити на 4, а отже вихідний вірусомісний матеріал розводять у співвідношенні 1:40 (яке міститиме в 4 рази більше вірусу (4 ГАО), ніж було у розведенні 1:160 (1 ГАО)).
 - 2.2. Для перевірки правильності приготування РДА контрольне титрування РДА проводять за схемою, наведеною у табл. 7.

Таблиця 7. Схема визначення робочої дози антигену (РДА)

Компоненти реакції, мл	Кількість гемаглютинуючих одиниць (ГАО)				
	4	2	1	1/2	1/4
Фізіологічний розчин	-	0,02	0,02	0,02	0,02
РДА	0,02	0,02→	0,02→	0,02→	0,02→
Еритроцити	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
Правильний результат	+	+	+	-	-

У 4 лунки планшету вносять по 0,02 мл фізіологічного розчину, починаючи з другої. До 1-ї і 2-ї лунок внести по 0,02 мл робочої дози антигену. Послідовно перенести по 0,02 мл з 2-ї лунки до 3-ї, з 3-ї - до 4-ї, з 4-ї - до 5-ї, з 5-ї 0,02 мл вилити до дезінфікуючого розчину. У всі лунки додати по 0,02 мл суспензії еритроцитів. Струснути, залишити при кімнатній температурі до появи візуальної реакції. Якщо дозу антигену підбрано правильно, в 1-й, 2-й, та 3-й лунках має спостерігатися чітка гемаглютинація, тоді як у 4-й та 5-й її не має бути. Якщо бажаний результат не отримано, то дозу антигену необхідно скоригувати, додаючи фізіологічний розчин (якщо гемаглютинація спостерігалася більш, ніж у 3 лунках) або вірус (якщо гемаглютинація спостерігалася менш ніж у 3 лунках), і повторно поставити контроль РДА на наявність 4 ГАО.

3. Основний дослід з використанням РГГА.

- 3.1. Досліджувані парні сироватки прогріти на водяній бані при температурі 56°C протягом 30 хв, розвести фізіологічним розчином у співвідношенні 1:10.
- 3.2. Приготувати послідовні серійні двократні розведення сироваток 1 і 2 на фізіологічному розчині. Для цього помістити у лунки 2 рядів планшету по 0,02 мл фізіологічного розчину. У 1-шу лунку 1-го ряду внести 0,02 мл сироватки 1 у розведенні 1:10 і зробити двократні серійні розведення до кінця ряду. У другому ряду планшету таким самим чином розвести сироватку 2. Надлишковий об'єм з останніх лунок обох рядів виливається у дезрозчин. При переході від однієї лунки до іншої потрібно міняти наконечники самплера.
- 3.3. В усі лунки додати РДА, що містить 4 ГАО, у кількості 0,02 мл. Планшет акуратно струснути і поставити інкубуватися контакт при температурі 37°C протягом 30-60 хв або за кімнатної температури на 1-2 год.
- 3.4. До кожної лунки планшету з реакційною сумішшю внести по 0,04 мл 1% суспензії еритроцитів. Планшет знову струснути і залишити до

осідання еритроцитів у контрольних лунках за тієї самої температури, за якої ставили РГА.

3.5. У РГГА необхідно поставити 2 контролю:

а) контроль еритроцитів на спонтанну гемаглютинацію (0,02 мл фізрозчину і 0,02 мл суспензії еритроцитів);

б) контроль сироватки на її здатність аглютинувати еритроцити (0,02 мл сироватки + 0,02 мл фізрозчину + 0,04 мл суспензії еритроцитів).

3.6. Облік РГГА проводити таким чином:

а) позитивний результат РЗГА - відсутність гемаглютинації в лунках (на відміну від РГА!!!);

б) титр антитіл у сироватці – граничне розведення сироватки, що повністю пригнічує гемаглютинуючу активність антигену, тобто аглютинація відсутня;

в) діагностичний титр антитіл у парних сироватках – це збільшення титру антитіл у другій сироватці порівняно з першою принаймні у 4 рази (табл. 8).

8). Аналогічну реакцію поставити з імунною сироваткою 2.

Таблиця 8. Схема титрування антивірусних антитіл в РГГА

Компоненти реакції, мл	Розведення сироватки							
	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280
Імунна сироватка 1	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
Вірус (4 ГАО = РДА)	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
	Інкубація при 37°C протягом 30 хв							
Еритроцити (1%)	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04

Контрольні запитання:

1. Як визначається титру вірусного антигену в РГА?
2. З яких основних етапів складається РГГА?
3. Від чого залежить вибір еритроцитів при постановці РГГА?

Завдання для самостійної роботи

1. З якою метою застосовується РГГА у вірусологічних реакціях?
2. Що являють собою парні сироватки? Навіщо їх вивчають?

Лабораторне заняття №12

СПЕЦИФІЧНА СЕРОДІАГНОСТИКА ВІРУСНИХ АНТИГЕНІВ У ТКАНИНАХ РОСЛИН МЕТОДОМ (ІМУНО)ФЛУОРЕСЦЕНТНОЇ МІКРОСКОПІЇ

Мета заняття: ознайомитися з основними методами роботи з люмінесцентним мікроскопом у вірусологічній лабораторії, отримати навички виявлення вірусних включень в рослинних клітинах, а також приготування препаратів та ідентифікації вірусів за допомогою імунофлуоресцентного аналізу.

Матеріальне забезпечення: живі рослини тютюну, інфіковані тобамовірусом (вірусовмісний матеріал); здорові рослини тютюну; фізіологічний розчин; 0,01М PBS, рН 8,0; трихлороцтова кислота (ТХУ); акридин оранжевий; поліклональні вірусоспецифічні антитіла, мічені фенілізотіоціанатом (ФІТЦ); ножиці; пінцети з тонкими гладкими і гострими браншами; стерильна вода; чашки Петрі; предметні та покривні скельця; фільтрувальний папір; рукавички.

Приготування зразків рослинної тканини для флуоресцентної мікроскопії

Хід роботи:

1. Приготувати зразки. Для цього зняти (відшарувати) нижній міжжилковий епідерміс листків з симптомами та листків без симптомів (з контрольних рослин).
2. Приготувати барвник (акридиновий оранжевий). Для цього спочатку приготувати розчинник (7 мл 0,9% хлориду натрія + 3 мл ФБР) та маточний розчин акридинового оранжевого 1:1000, тобто на 10 мл розчинника додати 0,01 г барвника. Потім приготувати робочий розчин, який в 10 разів менше концентрований, аніж маточний (1:10000).
3. Зразки перенести в чашку Петрі з водою (2-3 хв для розправлення плівки).
4. Провести фіксацію в 3% ТХУ (3 хв).
5. Відмити водою (3 хв).
6. Провести забарвлення акридиновим оранжевим в робочому розведенні (3 хв).
7. Відмити водою (3 хв).
8. Зразки перенести на предметне скельце (в краплю води) та покрити покривним скельцем. Надлишок води відібрати фільтрувальним папером.

9. Проглянути зразки в люмінесцентному мікроскопі с зеленим фільтром та сфотографувати результат. РНК-вмісні цитоплазматичні включення тобамовірусів будуть забарвлені в оранжевий колір, а ядерна ДНК – у зелений.

Пряме імунофлуоресцентне забарвлення зразків рослинної тканини

Хід роботи:

1. Приготувати зразки. Для цього зняти (відшарувати) нижній міжжилковий епідерміс листків з симптомами та листків без симптомів (з контрольних рослин).
2. Зразки перенести в чашку Петрі з водою (2-3 хв для розправлення плівки), а потім – на предметне скельце.
3. Обережно відібрати надлишок PBS з приготованого зрізу (п.9) фільтр папером, не торкаючись зрізів.
4. Нанести кон'югат (поліклональні вірусоспецифічні антитіла, мічені ФІТЦ) в робочому розведенні (приблизно 200 мкл, щоб покрити зразок) та інкубувати при 37°C протягом 30 хв.
5. Відмивати в трьох змінах PBS протягом 1 год.
6. Нанести середовище для фіксації (10% гліцерин у 0,01M PBS) та накрити покривним скельцем.
7. Проглянути зразки в люмінесцентному мікроскопі с зеленим фільтром та сфотографувати результат. Вірусні антигени, детектовані вірусоспецифічними антитілами, міченими ФІТЦ, будуть забарвлені в зелений колір.

Контрольні запитання:

1. В чому переваги флуоресцентної мікроскопії у порівнянні з імунофлуоресцентною мікроскопією?

2. В чому переваги імунофлуоресцентної мікроскопії у порівнянні з флуоресцентною мікроскопією?
3. В чому недоліки обох наведених вище протоколів?

Завдання для самостійної роботи

1. Мікроскопічні методи ідентифікації вірусів та вивчення цитопатології.
2. Поняття флуоресценції.
3. Флуоресцентні барвники у вірусології.
4. Методи кон'югації антитіл з барвниками.

Лабораторне заняття №13

ВИЗНАЧЕННЯ ТИТРУ ВІРУСОСПЕЦИФІЧНОЇ ПОЛІКЛОНАЛЬНОЇ АНТИСИРОВАТКИ МЕТОДОМ НЕПРЯМОГО ІМУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛІЗУ

Мета заняття: ознайомитися з принципами та різновидами імуноферментного аналізу (ІФА), набути практичних навичок роботи з вірусами та антивірусними імунними сироватками, опанувати методику постановки непрямого ІФА, встановити титр кролячої антивірусної сироватки методом непрямого ІФА.

Матеріальне забезпечення: очищений препарат вірусу; кроляча антивірусна сироватка; нормальна кроляча сироватка; мишачі антикролячі антитіла, мічені лужною фосфатазою; субстрат для лужної фосфатази; 96-лункові полістиролові планшети; самплери; наконечники для самплерів; термостат; холодильник; мікропланшетний спектрофотометр (ІФА-рідер); солі і реагенти для буферних розчинів; дистильована вода; фільтрувальний папір.

Хід роботи:

1. Приготувати буферні розчини:

1.1. **Фосфатний буфер (PBS), об'ємом 1 л**

NaCl – 40 г

KH₂PO₄ – 1 г

Na₂HPO₄ – 5,5 г (рН 7,4)

KCl – 1 г

Довести дистильованою водою до 1 л (рН 7,4)

1.2. **Карбонатний буфер (КБК), об'ємом 25 мл**

Na₂CO₃ – 40 мг

Na₂HCO₃ – 73 мг

Довести дистильованою водою до 25 мл (рН 9,6)

1.3. **Буфер відмивки, об'ємом 0,5 л**

Фосфатний буфер (PBS) + 0,2% Tween-20

1.4. Блокуючий буфер

PBS – 100 мл

Tween-20 – 0,25 мл

Сухе знежирене молоко – 5,0 г

1.5. Субстратний буфер

Діетаноламін – 97 мкл

H₂O – довести до 100 мл, рН довести до 9,8

2. Приготувати антиген (АГ, очищений препарат вірусу) в робочому розведенні 1 мкг/мл на КБК.
3. Замочити планшет у дистильованій H₂O на 20 хв.
4. Внести АГ по 100 мкл/лунку за схемою (табл. 9). Зверніть увагу, що лунка А1 завжди залишається пустою (туди вносять лише PBS) для калібрування «нуля» (інструментальної похибки) ІФА-рідера.
5. При постановці реакції використовується ряд негативних контролів:
 - К1 - контроль без антигену (замість антигену вноситься КБК);
 - К2 - контроль без перших антитіл (замість перших антитіл вноситься буфер для нанесення антитіл);
 - К3 - контроль без других антитіл (замість других антитіл вноситься буфер для нанесення антитіл);
 - К4 - контроль з нормальною сироваткою (замість перших антитіл вноситься нормальна кроляча сироватка у відповідному розведенні).
6. Планшет з АГ інкубувати при 40°C протягом ночі.
7. Після інкубації планшет промити буфером відмивки. Промивку проводити 3 рази по 5 хвилин на шейкері.
8. Антиген заблокувати блокуючим буфером протягом 2 годин при температурі 37°C.

9. Відмити планшет від блокуючого буферу, як описано вище.
10. Додати перші антитіла (кролячу антивірусну сироватку) у двократних розведеннях (1:250-1:16000) в 1% розчині сухого молока в PBS з додаванням 0,05% Tween-20 за схемою (табл. 9). Накритий планшет інкубувати в термостаті протягом 2 годин при 37°C.
11. Відмити від незв'язаних антитіл (див. п.5 вище).
12. Після відмивки додати мишачі антикролячі антитіла, мічені лужною фосфатазою, у робочому розведенні 1:1000 (1 мкл антитіл/1 мл буферу) в 1% розчині сухого молока в PBS з додаванням 0,05% Tween-20.
13. Інкубувати при 37°C протягом 2 годин.
14. Відмити 3 рази, як зазначено у п.5 вище, та додатково один раз чистим PBS (без Tween-20).
15. Внести субстрат Sigma 104 у субстратному буфері (1 мкг/мл) по 100 мкл в лунку. Розвиток забарвлення триває до 1 години.
16. Зупинити реакцію, додавши в лунки по 100 мкл 2М NaOH.
17. Результати зафіксувати за допомогою ІФА-рідера при довжині хвилі 405 нм.
18. Врахування результатів реакції: вирахувати середнє значення негативного контролю. Визначити позитивні зразки – позитивними вважати зразки, оптична густина яких перевищує значення оптичної густини негативного контролю у 3 рази.
19. Побудувати графік залежності оптичного поглинання від розведення сироватки.
20. Визначити титр та робоче розведення сироватки.

Титр – таке розведення антивірусної сироватки, при якому оптичне поглинання становить 0,250 оптичної одиниці.

Робоче розведення – таке розведення сироватки, при якому оптичне поглинання становить 1,5 оптичної одиниці.

Таблиця 9. Схема нанесення зразків на планшет для титрування антивірусної сироватки методом непрямого ІФА

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		1:250	1:500	1:1000	1:2000	1:4000	1:8000	1:16000				
B	ВТМ							→	К1	К1	К1	
C	ВТМ							→	К2	К2	К2	
D	ВТМ							→	К3	К3	К3	
E	Зд.с							→	К4	К4	К4	
F	Зд.с							→				
G	Зд.с							→				
H												

*ВТМ – вірус тютюнової мозаїки як модельний об'єкт

Контрольні запитання:

1. Чому в імуноферментному аналізі для детекції вірусів рослин використовують фермент лужну фосфатазу?

Лабораторне заняття №14

ДИФЕРЕНЦІАЛЬНА СЕРОЛОГІЧНА ДІАГНОСТИКА ВІРУСНИХ АНТИГЕНІВ У МАТЕРІАЛІ МЕТОДОМ ІМУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛІЗУ У МОДИФІКАЦІЇ «СЕНДВІЧ»

Мета заняття: ознайомитися з принципами та різновидами імуноферментного аналізу (ІФА), набути практичних навичок роботи з вірусами та антивірусними імунними сироватками, опанувати методику постановки ІФА у модифікації «сендвіч», встановити природу вірусного захворювання методом ІФА.

Матеріальне забезпечення: вірусомісні препарати (гомогенати рослин, уражених різними вірусами); візуально здорові рослини чи їх гомогенати; ступки з товчачиками; комерційні набори антивірусних антитіл до відповідних вірусів (в кожний набір входять: антивірусні антитіла (АТ1); антивірусні антитіла, мічені лужною фосфатазою (АТ2); позитивний контроль); субстрат для лужної фосфатази; 96-лункові полістиролові планшети; самплери; наконечники для самплерів; термостат; холодильник; мікропланшетний спектрофотометр (ІФА-рідер); солі і реагенти для буферних розчинів; дистильована вода; фільтрувальний папір.

Хід роботи:

1. Приготувати буферні розчини, як описано вище.
2. Скласти схему нанесення зразків у трьох повторах (табл. 10). Зверніть увагу, що лунка А1 завжди залишається пустою (туди вносять лише PBS) для калібрування «нуля» (інструментальної похибки) ІФА-рідера.
- 3.

Таблиця 10. Схема нанесення зразків на планшет для діагностики вірусів методом імуноферментного аналізу у модифікації «сендвіч»

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

4. Замочити планшет у дистильованій H_2O на 20 хв.
5. Розвести АТ1 у карбонатному буфері у співвідношенні 1:200 та внести всі необхідні лунки по 100 мкл у кожну.
6. Інкубувати АТ1 протягом 2-4 год при температурі $37^{\circ}C$ у термостаті.
7. Відмити планшет від неадсорбованих АТ1 3 рази по 5 хв буфером відмивки.
8. Внести АГ, К+, К- з розрахунку: 50 мкл буферу зразка + 50 мкл АГ (К+, К-).
9. Інкубувати АГ протягом ночі у холодильнику при $4^{\circ}C$.
10. Відмити плашку від АГ 3 рази по 5 хв буфером відмивки.
11. Розвести АТ2 у буфері зразка у співвідношенні 1:200.
12. Нанести розведені АТ2 у всі необхідні лунки по 100 мкл у кожну.
13. Інкубувати АТ2 протягом 2-4 год при температурі $37^{\circ}C$ у термостаті.
14. Відмити планшет від неадсорбованих АТ2 3 рази по 5 хв буфером відмивки та 1 раз 0,1М PBS протягом 5 хв.
15. Приготувати субстратний розчин: 1 мг субстрата +1 мл субстратного буферу.
16. Внести субстратний розчин у всі необхідні лунки по 100 мкл у кожну.
17. Інкубувати планшет у термостаті при температурі $37^{\circ}C$ протягом 1 год.
18. Результати зафіксувати за допомогою ІФА-рідера при довжині хвилі 405 нм.

Контролі постановки ІФА:

- К1 – без АГ (замість АГ внести буфер зразка)
- К2 – без АТ1 (замість АТ1 внести буфер зразка)
- К3 – без АТ2 (замість АТ2 внести буфер зразка)
- К- – сік здорових рослин
- К+ - комерційний позитивний контроль або власний позитивний контроль.

19. Врахування результатів реакції: вирахувати середнє значення негативного контролю. Визначити позитивні зразки – позитивними вважати зразки, оптична густина яких перевищує значення оптичної густини негативного контролю у 3 рази.

Контрольні запитання:

1. Які модифікації імуноферментного аналізу використовують для виявлення антитіл до вірусів людини, а які – переважно для діагностики вірусів, і чому?
2. Перелічіть основні компоненти імуноферментного аналізу незалежно від його модифікації.
3. Вкажіть переваги та недоліки непрямого варіанту ІФА.
4. Вкажіть переваги та недоліки непрямого ІФА у модифікації «сендвіч».
5. Для чого використовується ІФА?

Завдання для самостійної роботи

1. Ферменти, які використовуються для імуноферментного аналізу.
2. Модифікації імуноферментного аналізу.

СПИСОК РЕКОМЕНДОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Вірусологія. Навчальний посібник для лабораторних занять / В.П. Поліщук, І.Г. Будзанівська, Т.П. Шевченко, О.М. Андрійчук, Т.А. Компанець, О.А. Кондратюк, Г.В. Коротєєва, О.В. Молчанець, А.В. Харіна, О.В. Шевченко. – К.: ЦП «Компринт», 2017. – 242 с.
2. Вірусологія: підручник / І.Г. Будзанівська, Т.П. Шевченко, Г.В. Коротєєва, О.В. Молчанець, А.В. Харіна, Т.А. Компанець, О.М. Андрійчук, О.В. Шевченко, О.А. Кондратюк. – К.: ВПЦ «Київський університет», 2019. – 351 с.
3. Flint et al. Principles of Virology, 4th edition, 2015
4. Салига, Ю., Снітинський, В. Електронна мікроскопія біологічних об'єктів. Київ: Світ, 1999. – 152 с.
5. Посібник з медичної вірусології. За ред. Гиріна В.М.- К.: Здоров'я.- 1995.- 367с.
6. Шевченко Т.П., Будзанівська І.Г.Поліщук В.П. Віруси мікроорганізмів. Курс лекцій. –К: ЦОП «Глобус».-2013.-148с.
7. Сиволоб А. В. Молекулярна біологія : навч. посіб. / А. В. Сиволоб. - К. : ВПЦ "Київський університет", 2008. – 384 с.
8. Shevchenko T.P., Tymchyshyn O.V., Kosenko I.A., Budzanivska I.G., Shevchenko O.V., Polishchuk V.P. (2018) Molecular characterization and phylogenetic analysis of Ukrainian isolates of Cucumber mosaic virus based on the partial sequences of three genes. Biopolymers and Cell 34(1): 32-40.
9. Shevchenko O., Yasaka R., Tymchyshyn O., Shevchenko T., Ohshima K. (2018) First evidence of the occurrence of Turnip mosaic virus in Ukraine and molecular characterization of its isolate. Journal of Phytopathology 166 (6): 429-437.
10. Snihur H., Shevchenko T., Sherevera K., Budzanivska I., Shevchenko O. (2019) First report of onion yellow dwarf virus in Ukraine. Journal of Plant Pathology 101(4): 1283–1283.

11. Snihur H., Pozhylov I., Budzanivska I., Shevchenko O. (2019) First report of High Plains wheat mosaic virus on different hosts in Ukraine. *Journal of Plant Pathology* <https://doi.org/10.1007/s42161-019-00435-y>
12. Mahy et al. *Desk encyclopedia of human and medical virology*, 2010
13. Kawakubo Sh., Gao F., Li Sh., Tan Zh., Huang Y-K., Adkar-Purushothama C., Gurikar C., Maneechoat P., Chiemsombat P., Aye S., Furuya N., Shevchenko O., Spak J., Ho S., Ohshima K. (2021) Genomic analysis of the brassica pathogen turnip mosaic potyvirus reveals its spread along the former trade routes of the Silk Road. *PNAS* 118(12), <https://doi.org/10.1073/pnas.2021221118>
14. Pozhylov I, Snihur H, Shevchenko T, Budzanivska I, Liu W, Wang X, Shevchenko O. Occurrence and Characterization of Wheat Streak Mosaic Virus Found in Mono- and Mixed Infection with High Plains Wheat Mosaic Virus in Winter Wheat in Ukraine. *Viruses*. 2022; 14(6):1220.
15. Mishchenko L.T., Dunich A.A., Mishchenko I.A., Dashchenko A.V., Kozub N.O., Kyslykh T.M., Molodchenkova O.O. Wheat dwarf virus in Ukraine: occurrence, molecular characterization and impact on the yield // *Journal of Plant Diseases and Protection*. – 2022. – Vo.129. – P.107–116.
16. Sovinska R.S., Dunich A.A., Mishchenko L.T. Co-infection of bean yellow mosaic virus and cucumber mosaic virus in *Gladiolus* sp. plants: phylogenetic analysis of Ukrainian isolates // *Archives of Phytopathology and Plant Protection*. – 2022. – Vol. 55(3). – P. 303–330
17. Mishchenko L., Nazarov T., Dunich A., Mishchenko I., Ryshchakova O., Motsnyi I., Dashchenko A., Bezkravna L., Fanin Y., Molodchenkova O., Smertenko A. Impact of wheat streak mosaic virus on peroxisome proliferation, redox reactions, and resistance responses in wheat // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – Vol. 22(19).–P.10218.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АГ – антиген

АТ – антитіло

БСА – бичачий сироватковий альбумін

ВКП – вірус карликовості пшениці, wheat dwarf virus

ВМБ – вірус мозаїки бромусу, brome mosaic virus

ВТМ – вірус тютюнової мозаїки, tobacco mosaic virus

ЕДТА – етилендіамінтетраоцтова кислота ($C_{10}H_{16}N_2O_8$)

ЕФ – електрофорез

ІФА – імуноферментний аналіз

К – контроль

МВК – М-вірус картоплі, potato virus M

НК – нуклеїнова кислота

НШЦ – низькошвидкісне центрифугування

ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція

РНК – рибонуклеїнова кислота

ТЕМ – трансмісійна електронна мікроскопія

DAS-ELISA – **double-antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay**
(імуноферментний аналіз у модифікації «подвійний сендвіч»)

PBS – фосфатно-сольовий розчин

ҮВК – Ү-вірус картоплі, potato virus Y