



Міністерство освіти і науки України  
 Поліський національний університет  
 Житомирський державний університет імені Івана Франка  
 Інститут рибного господарства НААН України  
 Національний університет біоресурсів і природокористування України  
 Білоцерківський національний аграрний університет  
 Херсонський державний аграрно-економічний університет  
 Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Ґжицького  
 Державне агентство рибного господарства України  
 Житомирська філія державної установи «Інститут охорони ґрунтів України»

### III ВСЕУКРАЇНСЬКА НАУКОВО - ПРАКТИЧНА КОНФЕРЕНЦІЯ

## «ВОДНІ І НАЗЕМНІ ЕКОСИСТЕМИ ТА ЗБЕРЕЖЕННЯ ЇХ БІОРІЗНОМАНІТТЯ - 2020»



3 - 5 ЧЕРВНЯ 2020 РОКУ  
 м. ЖИТОМИР

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
ПОЛІСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
ЖИТОМИРСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ІВАНА ФРАНКА  
ІНСТИТУТ РИБНОГО ГОСПОДАРСТВА НААН УКРАЇНИ  
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ  
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ  
БЛОЦЕРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
ХЕРСОНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ АГРАРНО-ЕКОНОМІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ  
ТА БІОТЕХНОЛОГІЙ ІМЕНІ С. З. ГЖИЦЬКОГО  
ДЕРЖАВНЕ АГЕНТСТВО РИБНОГО ГОСПОДАРСТВА УКРАЇНИ  
ЖИТОМИРСЬКА ФІЛІЯ ДЕРЖАВНОЇ УСТАНОВИ  
«ІНСТИТУТ ОХОРОНИ ҐРУНТІВ УКРАЇНИ»

# **ВОДНІ І НАЗЕМНІ ЕКОСИСТЕМИ ТА ЗБЕРЕЖЕННЯ ЇХ БІОРІЗНОМАНІТТЯ – 2020**

ЗБІРНИК НАУКОВИХ ПРАЦЬ

Житомир - 2020  
ПНУ

ситуація призводить до загибелі личинок внаслідок різноманітних біотичних та абіотичних факторів зовнішнього середовища [5].

Личинки піленгаса є повністю сформовані у 25-30-добовому віці, вони мають довжину тіла 21 мм і вагу 100 мг [5].

За даними Моисеева та Волі: «піленгас веде пелагічний спосіб життя у ембріональній, личинковій і на початку малькового періодів, а у наступні – придонно-пелагічний, а з переходом від зоопланктонного типу живлення до детритного і починається у віці двох місяців при довжині тіла 30-35 мм пов'язана зміна способу життя» [3, 8].

### Література

1. Пряхин Ю.В. Піленгас в Азово-Черноморском бассейне: биология, уловы. / Ю.В. Пряхин // Материалы совещания "Состояние и перспективы научно-практических разработок в области марикультуры России". Изд. ВНИРО. М. 1996.-С. 262-264.

2. Воловик С.П. Состояние Азовской популяции пиленгаса и проблемы ее освоения / С.П. Воловик, Ю.В. Пряхин // Сб. Основные проблемы рыбного хозяйства и охраны рыбохозяйственных водоемов Азово-Черноморского бассейна. Ростов-на-Дону. 1997. С. 210-217.

3. Моисеев П.А. Морская аквакультура / П.А. Моисеев, А.Ф. Карпевич, О.Д. Романычева и др. – М.: Агропромиздат. – 1985.– 253 с.

4. Чесаліна Т.Л. Еколого-морфологічні особливості розмноження, розвитку і росту кефалі піленгаса (*Mugil soiyu* Basilewsky, 1855) в Азово-Чорноморському басейні / Т.Л. Чесаліна // дис. канд. біол. наук:– К., 2004.

5. Леонова Е. Ю. Эмбриональное и постэмбриональное развитие личинок глоссы (*Pleuronectes flesus luscus*) и пиленгаса (*Lizahaematocheilus*) в процессе искусственного воспроизводства / Е. Ю. Леонова. // Вісник Запорізького національного університету. – 2008. – № 2. – С. 118-124.

6. Місюра К. Особливості харчування личинок кефалевих риб [Електронний ресурс] : магістерська дисертація / Каріна Місюра. – Одеса, 2017.– 70 с. – Режим доступу: [http://eprints.library.odku.edu.ua/1762/1/Misura\\_M\\_2017.pdf](http://eprints.library.odku.edu.ua/1762/1/Misura_M_2017.pdf).

7. Опекунова А. А. Влияние микроводоросли *Isochrysis galbana* на рост и выживаемость личинок и молоди пиленгаса. [Электронный ресурс] / А. А. Опекунова // Труды ЮгНИРО. – Керчь: ЮгНИРО, 2013. – Т. 51. – С. 128-132. – Режим доступа: [http://aquacultura.org/upload/files/pdf/library/trudy/YugNIRO\\_proceedings\\_2013-vol.51.pdf](http://aquacultura.org/upload/files/pdf/library/trudy/YugNIRO_proceedings_2013-vol.51.pdf).

8. Воля Е. Г. Особенности нереста и нагула молоди пиленгаса в Хаджибейском лимане [Электронный ресурс] / Е. Г. Воля, А. И. Дручин, Г. Б. Черников. // «Современные проблемы экологии Азово-Черноморского региона»: III междунар. конф., 10-11 октября 2007 г.: материалы – Керчь: ЮгНИРО, 2008. – С. 10-14. – Режим доступа: <https://www.oceandocs.org/bitstream/handle/1834/947>.

УДК 575.17, 577.21, 639.57, 597.82

### ПЕРЕВАГИ МЕТОДУ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ В РЕАЛЬНОМУ ЧАСІ (ПЛР-РЧ, REAL-TIME PCR) В АКВАКУЛЬТУРІ

*Н.Є. Гриневич, В.С. Жарчинська*

Білоцерківський національний аграрний університет,  
пл. Соборна, 8/1, Біла Церква, Київська обл., 09117, Україна

Хвороби гідробіонтів наносять значних економічних збитків аквакультурі. Моніторинг закономірностей їх виникнення та поширення, розробка ефективних засобів

діагностики, профілактики та лікування – актуальне питання, що відображає ефективність відтворення та вирощування гідробіонтів. Діагностичні методи інфекційних хвороб, характеризується безперервним удосконаленням із пошуком та апробацією нових, ефективних, у тому числі експресних [2, 4, 6].

**Ключові слова:** аквакультура, гідробіонти, полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР-РЧ), ДНК, ізолят, СуHV-3, реакційна суміш, ефективність ампліфікації, детекція.

За даними Калачнюк: «Спосіб значного збільшення малих концентрацій певних фрагментів нуклеїнової кислоти (ДНК) в біологічному матеріалі (пробі), експериментальний метод молекулярної біології – полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) [3]. ПЛР на сьогоднішній день стала незамінним інструментом під час проведення сучасних молекулярно-біологічних досліджень. Використовуючи цей метод, можна ізолювати будь-який ген із будь-якого організму. Завдяки точності і швидкості, порівняно з численними іншими діагностичними методами, ПЛР набула актуальності під час діагностики захворювань гідробіонтів. Визначення та ідентифікація збудників бактеріальних та вірусних хвороб прискорюються до 24 годин. У разі, якщо збудник інфекційного захворювання важко ідентифікується за допомогою культуральних методів, застосування ПЛР виступає альтернативою для підтвердження присутності збудника в патологічному матеріалі [5].

Метод полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі (ПЛР-РЧ, Real-Time PCR) нині набуває дедалі більшого поширення для діагностики інфекційних хвороб в аквакультурі. Його принциповою особливістю є комплексний аналіз накопичення продуктів полімеразної ланцюгової реакції, а також автоматична реєстрація та інтерпретація отриманих результатів. Цей метод не потребує стадії електрофорезу, що спрощує вимоги до ПЛР-лабораторій [7, 8].

Варто відмітити, що ПЛР-РЧ відображає вихід продукту ампліфікації після кожного циклу. За отриманими даними створюється кінетична крива ПЛР і потім на основі аналізу отриманої кривої проходить розрахунок відносної концентрації субстрату. Весь процес перебігу реакції в реальному часі сканується на монітор комп'ютера. Для детекції ПЛР-продукту використовують барвники, які забезпечують флуоресценцію, прямо пропорційну кількості ПЛР-продукту (репортерна флуоресценція). Механізми генерації репортерної флуоресценції різняться залежно від типу ПЛР-РЧ [1, 4].

Існує два основних підходи до детекції результатів ПЛР у реальному часі: за допомогою інтеркалюючих барвників і на основі флуоресцентно – мічених олігонуклеотидних зондів [3, 4].

Нами експериментально проведено дослідження щодо встановлення у молюска *Rangia cuneata* герпесвірусу коропа кої третього типу (СуHV-3).

Полімеразну ланцюгову реакцію в реальному часі (ПЛР-РЧ) проводили на ізолятах двостулкового молюска *Rangia cuneata* (або *Atlantic rangia*). Реакційна суміш для проведення ПЛР-РЧ містила: MIX → H<sub>2</sub>O – 3,65 мкл (29,2); Mix (Probe RT-Master Mix) – 5 мкл (40); S<sub>1</sub> – 0,15 мкл (1,2); S<sub>2</sub> – 0,15 мкл (1,2); proba sonda – 0,05 мкл (0,4); DNA (ДНК) – 1 мкл. Потім додали до кожної із попередньо підготовлених пробірок типу епендорф по 8 мкл міксу. Змішування проводили за допомогою міні-центрифуги Combi-Spin FVL – 2400N (BioSan).

Після центрифугування, досліджуваний матеріал поміщали в ампліфікатор LightCycler® 480 II (Roche). Схема обробки в ампліфікаторі: preincubation – 1 цикл – 95°C – 10 хв; amplification – 95°C – 10 сек., 60°C – 30 сек. – 45 циклів; cooling – 40°C – 10 сек. – 1 цикл з наступним отриманням графіків ампліфікації.

Для оцінювання ефективності ампліфікації використовували такі критерії: значення кута нахилу кінетичної кривої (A), ефективність ампліфікації (E) та значення коефіцієнта кореляції R<sup>2</sup>. Результати реакції вважали задовільними, адже значення кута нахилу кривої

лежить в діапазоні від  $-3.6 \leq A \leq -3.1$ , що відповідає ефективності ампліфікації 90-110%, а середнє значення коефіцієнта кореляції  $R^2 \geq 0,98$ .

Флуоресцентний сигнал вимірювали на стадії гібридизації і синтезу у кожному циклі ампліфікації. Граничну лінію та базовий рівень флуоресценції розраховували автоматично по завершенню реакції. Обробку отриманих результатів здійснювали у відповідності до інструкції виробника приладу і програмного забезпечення.

Отже, експериментально підтверджено відсутність у молюска *Rangia cuneata* герпесвірусу коропа кої третього типу (СуHV-3).

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Аукунов Н. Е., Масабаева М. Р., Хасанова У. У. Выделение и очистка нуклеиновых кислот. Состояние проблемы на современном этапе / Н. Е. Аукунов, М. Р. Масабаева, У. У. Хасанова // Наука и здравоохранение. – 2014 – № 1 – С. 51 – 53.

2. Завьялова Е. А. Индикация и идентификация некоторых особо опасных вирусов рыб методом ПЦР / Е. А. Завьялова, Н. Ю. Кандрин, Н. Ф. Ломакина // Рыбоводство и рыбное хозяйство. – 2015 – № 3 – С. 21 – 25.

3. Калачнюк М. С. Умови проведення полімеразної ланцюгової реакції у лабораторній практиці (методичні аспекти) / М. С. Калачнюк, Л. Г. Калачнюк, Д. О. Мельничук, С. Д. Мельничук, Г. І. Калачнюк // Біологія тварин. – 2012 – Т. 14. – № 1 – 2. С. 660 – 667.

4. Методичні рекомендації щодо використання полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі для ідентифікації патогенної мікрофлори у продовольчій сировині і харчових продуктах / Р. В. Облап, Н. Є. Гриневич, Н. Б. Новак, Т. М. Димань / За ред. Т. М. Димань. – Біла Церква, 2018. – 30 с.

5. Полімеразна ланцюгова реакція : методичні рекомендації / Т. М. Димань, В. І. Глазко. – Біла Церква, 2004. – 62 с.

6. Рудь Ю. П. Молекулярне визначення інфекційних захворювань риб / Ю. П. Рудь, Л. П. Бучацький // Тваринництво України. – 2016 – № 4 – 5 – С. 28 – 31.

7. Спиридонов В. Г. Розроблення методики ДНК-ідентифікації осетрових видів риб з використанням полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі / В. Г. Спиридонов // Рибогосподарська наука України. – 2017 – № 2 – С. 60 – 67.

8. Heather J. M. The sequence of sequencers : the history of sequencing DNA / J. M. Heather, V. Chain // Genomics. – 2016 – Vol. 107 (1). P. 1 – 8.