

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего
образования
«СЕВЕРО-КАВКАЗСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ
к выполнению лабораторных работ по дисциплине
«Генетика вирусов»

Направление подготовки	06.03.01 Биология
Направленность (профиль)	Генетика, селекция и биоинформатика

Ставрополь, 2026

1. Цель и задачи освоения дисциплины

Целью изучения данной дисциплины является ознакомить студентов с общим представлением о материальных основах наследственности вирусов. Сформировать представление о принципах и методах культивирования вирусов. Иметь представление о генетическом анализе у вирусов. Усвоить основные закономерности изменчивости вирусов (мутации, модификации); естественного и индуцированного мутационного процесса. Иметь представление о мутагенах окружающей среды и методах их тестирования. Четко представлять молекулярные механизмы генетических процессов.

2. Место дисциплины в структуре образовательной программы

Дисциплина «Генетика вирусов» относится к дисциплинам части, формируемой участниками образовательных отношений.

3. Перечень планируемых результатов обучения по дисциплине, соотнесённых с планируемыми результатами освоения образовательной программы

Код, формулировка компетенции	Код, формулировка индикатора	Планируемые результаты обучения по дисциплине, характеризующие этапы формирования компетенций, индикаторов
ПК-3. Способен использовать знания о биологическом разнообразии, эволюции и филогении растений, животных и микроорганизмов в профессиональной деятельности;	ИД-1 ПК 3 Использует знания о биологическом разнообразии, эволюции и филогении растений, животных и микроорганизмов в профессиональной деятельности; ИД-2 ПК 3 Планирует и проводит исследования анатомии, морфологии, физиологии, эволюции и филогении различных групп растений, животных и микроорганизмов; ИД-3 ПК 3 Самостоятельно работает с биологическими объектами, собирает гербарии, коллекции животных, пробы микроорганизмов	Готовность решать задачи и реализовывать проекты в области биологии
ПК-4. Способен использовать в профессиональной деятельности знания о молекулярных механизмах основных генетических процессов	ИД-1 ПК 4 Использует в профессиональной деятельности знания о молекулярных механизмах основных генетических процессов ИД-2 ПК 4 Самостоятельно организует, планирует и реализует генетические и молекулярно-биологические исследования ИД-3 ПК-4 Владеет знаниями о структуре и функциях белков и нуклеиновых кислот, принципах и механизмах	Готовность решать задачи и реализовывать проекты в области биологии

	хранения и передачи, изменчивости, реализации и воспроизведения генетической информации; строении геномов разных организмов, структурно-функциональной организации генов и геномов. ИД-4 ПК-4 Владеет знаниями о современных методах редактирования генома ИД-5 ПК-4 Способен применять основные молекулярно-генетические и молекулярно-биологические методы исследований для решения задач профессиональной деятельности в области генетики и генетических технологий	
ПК-5. Способен использовать в профессиональной деятельности современное биологическое оборудование и биоинформационные технологии.	ИД-1 ПК 5 Способен квалифицированно использовать современное лабораторное оборудование, приборы и инструменты, применяемые в генетических технологиях, в том числе, в генетическом редактировании; ИД-2 ПК 5 Способен использовать базовые знания фундаментальных разделов математики и биоинформатики в объеме, необходимом для обработки информации и анализа данных в соответствии с задачами генетики, геномики и генетических технологий	Готовность решать задачи и реализовывать проекты в области биологии Способность применять современные информационные технологии для решения задач профессиональной деятельности

4. Объем учебной дисциплины и формы контроля *

Объем занятий: всего: 3 з.е. астр.ч. 108	ОФО, в астр. часах
Контактная работа:	108
Лекции/из них практическая подготовка	28
Лабораторных работ/из них практическая подготовка	56
Самостоятельная работа	24
Формы контроля	
Зачет	

* Дисциплина (модуль) предусматривает применение электронного обучения, дистанционных образовательных технологий (если иное не установлено образовательным стандартом)

5. Содержание дисциплины (модуля), структурированное по темам (разделам) с указанием количества часов и видов занятий

№ п/п	Раздел (тема) дисциплины и краткое содержание	Формируемые компетенции, индикаторы	Очная форма			
			Контактная работа обучающихся с преподавателем /из них в форме практической подготовки, часов			Самостоятельная работа, часов
			Лекции	Практические занятия	Лабораторные работы	
1	История открытия и изучения вирусов. Вирион. Размер и форма вириона. Состав вириона.	ИД 1 ПК-3 ИД 2 ПК-3 ИД 1 ПК-4 ИД 2 ПК-4	2		4	2
2	Размер и форма вириона. Состав вириона.	ИД 1 ПК-3 ИД 2 ПК-3 ИД 1 ПК-4 ИД 2 ПК-4	2		4	2
3	Вирусный геном. Онтогенез вирусов. Прикрепление вириона к клетке-хозяину, или адсорбция. Транслокация вириона. Проникновение и раздевание вируса. Репродукция вируса. Морфогенез вириона и выход вирусного потомства из клетки-хозяина.	ИД 1 ПК-3 ИД 2 ПК-3 ИД 1 ПК-4 ИД 2 ПК-4	2		4	2
4	Типы вирусных инфекций. Естественная защита от вирусных инфекций. Система рестрикции/модификации. Система CRISPR/cas.	ИД 1 ПК-3 ИД 2 ПК-3 ИД 1 ПК-4 ИД 2 ПК-4	2		4	2
5	РНК-сайленсинг. Апоптоз, индуцированный вирусами. Антивирусное действие интерферона.	ИД 1 ПК-3 ИД 2 ПК-3 ИД 1 ПК-4 ИД 2 ПК-4	2		4	2
6	Систематика и биоразнообразие вирусов. Роль вирусов в экосистемах. Происхождение и эволюция вирусов.	ИД 1 ПК-3 ИД 2 ПК-3 ИД 1 ПК-4 ИД 2 ПК-4	2		4	2
7	Вирусы бактерий (бактериофаги). История изучения бактериофагов.	ИД 1 ПК-3 ИД 2 ПК-3 ИД 1 ПК-4 ИД 2 ПК-4 ИД-1 ПК 5	2		4	2
8	Основные особенности бактериофагов. Культивирование, количественный	ИД 1 ПК-3 ИД 2 ПК-3	2		4	2

	учет и препаративное получение бактериофагов. Онтогенез бактериофагов. Взаимодействие фага с бактериальной клеткой (литический и лизогенный циклы). Трансдукция (общая, специализированная, abortивная).	ИД 1 ПК-4 ИД 2 ПК-4 ИД-1 ПК 5				
9	Биоразнообразие бактериофагов. Бактериофаги с геномной dsДНК: Фаг T4. Фаг T7. Фаг лямбда. Фаг PRD1. Бактериофаги с геномной ssДНК(+): Фаг M13. Фаг фX174. Бактериофаги с геномной dsРНК. Бактериофаги с геномной ssРНК(+).	ИД 1 ПК-3 ИД 2 ПК-3 ИД 1 ПК-4 ИД 2 ПК-4 ИД-1 ПК 5	2		4	2
10	Вирусы архей. Вирусы архей из филы Euryarchaeota. Вирусы экстремальногалофильных архей. Вирусы метаногенных архей. Вирус гипертермофила Pyrococcus. Вирусы архей из филы Crenarchaeota.	ИД 1 ПК-3 ИД 2 ПК-3 ИД 1 ПК-4 ИД 2 ПК-4	2		4	2
11	Вирусы протистов, грибов и водорослей. Вирусы протистов и водорослей, содержащие геномную dsДНК. Вирусы протистов, грибов и водорослей, содержащие геномную dsРНК Вирусы протистов и грибов, содержащие геномную ssРНК(+)	ИД 1 ПК-3 ИД 2 ПК-3 ИД 1 ПК-4 ИД 2 ПК-4	2		4	1
12	Вирусы высших растений (фитовирусы). Основные особенности фитовирусов. Методы культивирования фитовирусов. Симптомы фитовирусной инфекции. Способы заражения фитовирусами. Пути распространения фитовирусов в теле растения. Биоразнообразие фитовирусов. Фитовирусы с геномной ssДНК. Фитовирусы с геномной dsРНК. Фитовирусы с геномной ssРНК(+). Фитовирусы с геномной ssРНК(-). Фитовирусы с геномной dsДНК, имеющие стадию обратной транскрипции. Борьба с фитовирусной	ИД 1 ПК-3 ИД 2 ПК-3 ИД 1 ПК-4 ИД 2 ПК-4	2		4	1

	инфекцией.					
13	Вирусы животных. Общие свойства вирусов животных. Онтогенез вирусов животных. Специфичность вирусов животных. Систематика вирусов животных. Методы культивирования вирусов животных. Типы инфекций, вызываемых вирусами животных. Методы наблюдения и изучения строения вирусов животных. Биоразнообразие вирусов животных. Вирусы животных, содержащие геномную dsДНК. Вирусы животных, содержащие геномную ssДНК. Вирусы животных, содержащие геномную dsРНК. Вирусы животных, содержащие геномную ssРНК(+) и не имеющие стадию обратной транскрипции. Вирусы животных, содержащие геномную ssРНК(-). Вирусы животных, содержащие геномную ssРНК(+) и имеющие стадию обратной транскрипции. Вирусы животных, содержащие геномную dsДНК и имеющие стадию обратной транскрипции.	ИД 1 ПК-3 ИД 2 ПК-3 ИД 1 ПК-4 ИД 2 ПК-4	2		4	1
14	Вирусы человека. Вспышки новых для человека вирусных инфекций.	ИД 1 ПК-3 ИД 2 ПК-3 ИД 1 ПК-4 ИД 2 ПК-4 ИД-1 ПК 5	2		4	1
	ИТОГО за 6 семестр		28		56	24
	ИТОГО		28		56	24

СТРУКТУРА И СОДЕРЖАНИЕ ЛАБОРАТОРНЫХ РАБОТ

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 1 (1).

ИСТОРИЯ ОТКРЫТИЯ И ИЗУЧЕНИЯ ВИРУСОВ. СРАВНЕНИЕ ВИРУСОВ И БАКТЕРИЙ.

Цель работы: Изучить этапы открытия вирусов, познакомиться с ключевыми учёными, внесшими вклад в вирусологию, и понять, как развивались методы исследования вирусов на протяжении истории. Сравнить вирусы и бактерии.

Ход работы:

Теоретическая часть

Генетика вирусов - это раздел вирусологии, изучающий структуру, функционирование, наследственность и изменчивость генетического материала вирусов, а также механизмы его репликации, экспрессии и эволюции.

Предпосылки открытия вирусов

До конца XIX века считалось, что все инфекционные заболевания вызываются бактериями или другими микроорганизмами, видимыми в световой микроскоп. Однако некоторые болезни (например, бешенство, оспа, табачная мозаика) не удавалось связать с известными возбудителями, возбудитель не обнаруживался под микроскопом и проходил через бактериальные фильтры.

Открытие «фильтруемых агентов»

- **1892 г.** - русский ботаник **Дмитрий Иосифович Ивановский** впервые обнаружил, что сок, взятый из листьев табака, больных мозаичной болезнью, остаётся заразным даже после прохождения через фарфоровые бактериальные фильтры (изобретённые Шамберланом). Он предположил существование нового типа возбудителя, но не дал ему чёткого определения.
- **1898 г.** - голландский микробиолог **Мартинус Бейеринк** повторил опыты Ивановского и назвал новый возбудитель «*contagium vivum fluidum*» («заразное живое жидкое вещество»). Именно Бейеринк считают основателем вирусологии как науки, поскольку он ввёл термин «**вирус**» в его современном смысле.
- **1898 г.** Ф. Лёффлер и П. Фрош - открыли вирус ящура у животных, подтвердив существование фильтрующихся возбудителей и у животных.

Развитие вирусологии в XX веке

- **1915–1917 гг.** - открытие бактериофагов (вирусов, поражающих бактерии): независимо друг от друга Ф. Туорт (Англия) и Ф. д'Эрелль (Франция).
- **1935 г.** - **Уэнделл Стэнли** (США) впервые выделил вирус табачной мозаики в кристаллической форме, доказав, что вирусы могут существовать вне живой клетки в виде неклеточных частиц.
- **1939 г.** - с помощью электронного микроскопа впервые визуализированы вирусы (в том числе вирус табачной мозаики).
- **1952 г.** - эксперимент Герши и Чейза подтвердил, что генетическим материалом у многих вирусов является ДНК (а позже - у других - РНК).
- **1970-е - 1980-е гг.** - развитие молекулярной вирусологии, открытие ретровирусов (включая ВИЧ), рекомбинантных ДНК-технологий.

Задание 1: Анализ исторического эксперимента

Прочитайте описание эксперимента Ивановского (1892 г.) и ответьте на вопросы:

1. Почему он использовал бактериальные фильтры?
2. Какой вывод можно сделать из того, что фильтрат оставался заразным?
3. Почему Ивановский не сделал вывод о существовании нового типа возбудителя?

Эксперимент Д. И. Ивановского в 1892 году был посвящён изучению возбудителя мозаичной болезни табака. Он провёл следующие ключевые действия:

Измельчил листья больных растений табака и получил из них сок.

Пропустил этот сок через бактериальные фильтры (керамические фильтры Шамберлана), которые в то время считались способными задерживать все известные микроорганизмы, включая бактерии.

Полученный фильтрат (жидкость, прошедшая через фильтр) ввёл здоровым растениям - и они заболели.

1. Почему он использовал бактериальные фильтры?

Ивановский использовал бактериальные фильтры, чтобы проверить гипотезу, что возбудитель болезни - это бактерия. В то время считалось, что все инфекционные агенты - это бактерии, и фильтры Шамберлана задерживают любые микроорганизмы. Если бы возбудитель был бактерией, он остался бы на фильтре, и фильтрат был бы не заразным.

2. Какой вывод можно сделать из того, что фильтрат оставался заразным?

Тот факт, что фильтрат оставался заразным, указывает на то, что возбудитель болезни меньше бактерий и способен проходить через фильтры, которые задерживают бактерии. Это означает, что возбудитель - не бактерия, а нечто иное, гораздо более мелкое.

3. Почему Ивановский не сделал вывод о существовании нового типа возбудителя?

Ивановский не сделал окончательного вывода о существовании нового типа возбудителя (вирусов), потому что в то время не существовало концепции вирусов. Он предположил, что, возможно, бактерии выделяют токсин или растворимое ядовитое вещество, которое и вызывает болезнь. Кроме того, он не полностью исключил возможность, что бактерии каким-то образом прошли через фильтр (например, из-за повреждения фильтра). Лишь позже, в 1898 году, Мартин Бейеринк повторил эксперимент и предложил идею «заразного живого жидкого агента», который он назвал «вирусом».

Задание 2. Заполнить хронологическую таблицу, указав дату, имя учёного и его вклад в открытие/изучение вирусов

Год	Ученый	Вклад
1892	Д. И. Ивановский	
1901; 1902	У. Рид (W. Reed), Д. Кэррол (J. Carrol)	
1898	М. Бейеринк	
1935	У. Стэнли	
1939	Г. Руска и др.	
1952	А. Херши (A. Hershey), М. Чейз (M. Chase)	
1979	Д. Майер (J. Mayer), Ф. Тэйлор (F. Taylor)	
1981	Д. Skeэль (J. Skehel) и др.	
1993	Р. Робертс (R. Roberts), Великобритания, Ф. Шарп (P. Sharp), США	
2000-	Учёные из CDC, Китайской академии наук (Pei-Yong Shi, Guan Yi, и др.)	
2005	Jeffery Taubenberger (NIH), Terrence Tumpey (CDC)	
2008	Edward C. Holmes, Andrew Rambaut, Oliver Pybus	
2012	Emmanuelle Charpentier & Jennifer Doudna	
2023	Jesse Bloom (Fred Hutch), Alex Sigal (Africa Health Research Institute)	
2025	Институты: Harvard Wyss, CEPI, WHO BioHub, российские группы (Вектор, МГУ)	
2000-	Учёные из CDC, Китайской академии наук (Pei-Yong Shi, Guan Yi, и др.)	

2005	Jeffery Taubenberger (NIH), Terrence Tumpey (CDC)	
2008	Edward C. Holmes, Andrew Rambaut, Oliver Pybus	
2012	Emmanuelle Charpentier & Jennifer Doudna	
2023	Jesse Bloom (Fred Hutch), Alex Sigal (Africa Health Research Institute)	
2025	Институты: Harvard Wyss, CEPI, WHO BioHub, российские группы (Вектор, МГУ)	

Задание 3. Описать современные методы изучения вирусов

Микроскопия

Молекулярно-генетические методы

Культуральные методы

Иммунологические методы

Биоинформатика

Транскриптомика, протеомика

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 1 (2). СРАВНЕНИЕ ВИРУСОВ И БАКТЕРИЙ.

Цель работы: сравнить вирусы и бактерии.

Ход работы:

Теоретическая часть

Ключевые особенности генетики вирусов:

1. Разнообразие генетического материала

Вирусы обладают уникальным разнообразием типов геномов:

- ***По химической природе:*** ДНК или РНК (никакой другой организм не использует РНК как основной генетический материал).
- ***По числу цепей:*** одноцепочечные (сс) или двухцепочечные (дц).
- ***По полярности РНК:*** (+)РНК (непосредственно служит мРНК), (-)РНК (требует синтеза комплементарной цепи), двойная РНК.
- ***По сегментации:*** несегментированный или сегментированный геном (например, у гриппа — 8 сегментов РНК).

2. Компактность и эффективность генома

- Вирусные геномы очень компактны (от ~2 тыс. до ~2.5 млн пар нуклеотидов).
- Активно используются механизмы экономии генетического материала:
 - Перекрывающиеся гены
 - Альтернативный сплайсинг
 - Полипротеины (единый белок, разрезаемый на функциональные единицы)

3. Высокая изменчивость

- ***Мутации:*** особенно высокая частота у РНК-вирусов из-за отсутствия коррекции ошибок у РНК-зависимой РНК-полимеразы (10^{-3} – 10^{-5} ошибок на нуклеотид против 10^{-8} – 10^{-11} у клеток).
- ***Рекомбинация:*** обмен участками генома между вирусами одного типа в одной клетке-хозяине.

4. Репликация и экспрессия

Механизмы зависят от типа генома (классификация Балтимора, 7 классов):

Типы геномов – основа Балтийской классификации (Дэвид Балтимор, 1971)

Группа	Тип генома	Примеры	Ключевая особенность
1	дсДНК	Аденовирусы, герпесвирусы	Репликация в ядре через ДНК-зависимую ДНК-полимеразу
2	оцДНК	Парвовирусы	Требуют деления клетки для репликации
3	дсРНК	Реовирусы	РНК-зависимая РНК-полимераза (РНК-РНК-пол) в вирионе
4	(+)-оРНК	Коронавирусы, пикорнавирусы	Геном = мРНК, сразу транслируется рибосомами
5	(-)-оРНК	Вирус гриппа, Эбола	Требуют вирионной РНК-РНК-пол для синтеза (+)-РНК
6	оРНК-ретро	ВИЧ	Обратная транскриптаза → ДНК-провирус в геноме хозяина
7	дсДНК-ретро	Гепаднавирусы (ВГВ)	РНК-промежуточная + обратная транскриптаза при репликации

- ДНК-вирусы обычно реплицируются в ядре с использованием клеточных ферментов.
- РНК-вирусы реплицируются в цитоплазме с помощью вирусной РНК-полимеразы.
- Ретровирусы (ВИЧ) используют обратную транскриптазу для синтеза ДНК из РНК.

5. Практическое значение

- **Эпиднадзор:** секвенирование геномов для отслеживания мутаций и вспышек (например, мониторинг вариантов SARS-CoV-2).
- **Вакцины:** *живые аттенуированные* (это вакцины, содержащие ослабленные (аттенуированные), но жизнеспособные штаммы возбудителей инфекционных заболеваний, которые утратили способность вызывать тяжёлую болезнь, но сохраняют иммуногенность), *мРНК-вакцины* (вакцины на основе матричной рибонуклеиновой кислоты) — это современный тип вакцин, использующих синтетическую мРНК для обучения иммунной системы распознавать и бороться с патогенами (обычно вирусами)., *векторные вакцины* основаны на генетических принципах.
- **Антимикробная резистентность:** изучение мутаций, приводящих к устойчивости к противовирусным препаратам.
- **Генная терапия:** модифицированные вирусы как векторы для доставки генов.

Генетика вирусов играет ключевую роль в понимании патогенеза, разработке диагностических методов и борьбе с вирусными инфекциями, особенно в условиях возникновения новых угроз (например, вирусов с высоким потенциалом пандемий).

Задание 1. Составить таблицу «Сравнение вирусов и бактерий» по следующим параметрам:

- Размер
- Наличие клеточного строения
- Способ размножения
- Чувствительность к антибиотикам
- Методы визуализации

Параметр	Вирусы	Бактерии
Размер		
Наличие клеточного строения		
Способ размножения		

Чувствительность антибиотикам	к		
Метода визуализации			

Вывод: Бактерии представляют собой самостоятельные прокариотические клетки, обладающие всеми признаками живого организма: собственным метаболизмом, способностью к автономному размножению и энергетическому обмену. Вирусы же являются неклеточными инфекционными агентами, лишенными собственного метаболизма и способными к репликации исключительно внутри клеток-хозяев, что ставит их на границе живой и неживой материи.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 2 (1)

ВИРИОН. РАЗМЕР, ФОРМА И СОСТАВ ВИРИОНА

Цель работы: определить структуру и функции вириона, изучить физические характеристики (размер и форма) вириона.

Ход работы:

Теоретическая часть

Вирусы – неклеточные формы жизни, обладающие собственным геномом, способностью к воспроизведению (репродукции) в клетках живых организмов

Различают две формы (стадии) существования вируса - *внеклеточную и внутриклеточную*.

Внеклеточный вирус называется вирионом Он состоит из генетического материала (ДНК или РНК), заключённого в белковую оболочку - капсид, и, в некоторых случаях, окружён липидной оболочкой.

Внутриклеточный вирус вегетативный вирус репродуцируется в клетках живых организмов, с образованием потомства.

Некоторые вирусы способны встраивать свой генетический материал в хромосому клетки-хозяина в виде **провируса** (интегративная форма). **Провирус** может долгое время оставаться «спящим» (не продуцировать новые вирионы), избегая иммунного ответа. Активация возможна под влиянием стресса, иммунодепрессии или других триггеров.

Не все вирусы образуют провирусы: Термин в основном применяется к ретровирусам. **ВИЧ:** Провирусная форма - главная причина неизлечимости ВИЧ-инфекции; антиретровирусная терапия подавляет активацию, но не устраняет провирус. Интеграция провируса рядом с онкогенами может спровоцировать рак (например, вирус лейкоза кошек).

Классификация вирусов

1. по типу нуклеиновой кислоты (ДНК-вирусы, РНК-вирусы)
2. по особенностям нуклеиновой кислоты (позитивная или негативная РНК; линейная, круговая или сегментарная)
3. по наличию оболочек (простые (капсид) и сложные (капсид+суперкапсид))

Основные компоненты вириона:

- **Геном** – ДНК или РНК (одно- или двухцепочечная, линейная или кольцевая, сегментированная или несегментированная);
- **Капсид** – белковая оболочка, образованная повторяющимися субъединицами (капсомерами), защищающая геном;
- **Суперкапсид (вирусная оболочка)** – липопротеиновая мембрана, присутствующая у оболочечных вирусов (приобретается при выходе из клетки-хозяина);

- **Ферменты** – вирус-специфические белки (например, РНК-зависимая РНК-полимераза у (-)РНК-вирусов, обратная транскриптаза у ретровирусов).

Задание 1. Заполнить таблицу «Структурные компоненты вирионов»

Компонент	Функция	Пример вируса, содержащего компонент
Капсид		
Суперкапсид		
Гликопротеиновые шипы		

Задание 2. Сравнить безоболочные вирусы и оболочные вирусы

В соответствии с типом строения вириона выделяют две основные группы вирусов: **безоболочные вирусы** и **оболочные вирусы**. Они различаются механизмом проникновения в клетку, а также способом выхода из нее потомства вирионов.

Вирион **оболочных вирусов** представляет собой нуклеокапсид, окруженный внешней оболочкой, или суперкапсидом.

Устойчивость:

- Высокая устойчивость к внешним факторам (высыхание, кислая среда ЖКТ, детергенты)
- Дольше сохраняются во внешней среде

Механизм выхода: Покидают клетку-хозяина путём лизиса (разрушения клеточной мембраны), что приводит к гибели клетки.

Примеры:

Аденовирусы (ОРВИ, конъюнктивит)

Норовирусы (кишечные инфекции)

Ротавирусы (диарея у детей)

Вирус папилломы человека (ВПЧ)

Вирион **безоболочных** вирусов состоит из геномной нуклеиновой кислоты, заключенной в белковый футляр, или капсид.

Устойчивость:

- Низкая устойчивость к внешним факторам (чувствительны к высыханию, жирам, спиртам, детергентам)
- Быстро инактивируются во внешней среде

Механизм выхода: Покидают клетку путём **почкования** (без немедленного разрушения клетки), что позволяет клетке некоторое время продолжать функционировать.

Примеры:

○ Вирус гриппа

○ Коронавирусы (включая SARS-CoV-2)

○ Вирус герпеса

- Вирус гепатита С
- Бешенства

Задание 3. Размеры вирионов

Размеры вирионов значительно меньше размеров бактерий и варьируют от 20 до 400 нм. Некоторые гигантские вирусы (например, *Mimivirus*) могут достигать до 500 нм и даже более, что позволяет наблюдать их в световом микроскопе при специальных условиях. Пикорнавирусы 20-30 нм, Аденовирусы – 70-90 нм, Ортомиксовирусы (грипп) – 80-120 нм, Поксвирусы – 200-400 нм.

Почему размеры вирусов измеряются в нанометрах?

Вирусы чрезвычайно малы - их размеры обычно варьируются от 20 до 300 нм. Они значительно меньше бактерий и не видны в световой микроскоп, поэтому для их измерения используются единицы, соответствующие масштабу ультраструктуры - нанометры (1 нм = 10^{-9} м).

Форма вирионов чрезвычайно разнообразна и определяется симметрией капсида.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 2 (2) **ВИРИОН. СОСТАВ ВИРИОНА**

Цель работы: изучить химические составляющие вириона и методы их определения.

Ход работы:

Задание 1. Заполнить таблицу «Химический состав вириона»

Компонент	Содержание (%)	Функции	Примеры
Нуклеиновые кислоты			
Белки			
Липиды			
Углеводы			

Задание 2. Заполнить таблицу «Форма вирионов»

Тип симметрии	Структурные особенности	Форма вириона	Примеры вирусов
Икосаэдрическая (кубическая)			
Спиральная			
Комплексная			

Задание 3. Безоболочечные и оболочечные вирусы: ключевые различия

«Голые» вирусы не имеют липидной оболочки; их капсид напрямую окружает генетический материал. Они более устойчивы во внешней среде.

Особенности оболочечных вирусов: Наличие липидной оболочки придаёт частице округлую или плейоморфную (изменчивую) форму (например, вирусы гриппа, коронавирусы, ВИЧ).

Связь формы вириона со способом проникновения в клетку

Икосаэдрические «голые» вирусы (аденовирусы) - обычно проникают путём рецептор-опосредованного эндоцитоза, затем разрушают мембрану эндосомы и высвобождают геном в цитоплазму.

Спиральные оболочечные вирусы (вирус гриппа) - сливают свою оболочку с мембраной эндосомы при низком pH, высвобождая нуклеокапсид в цитоплазму.

Оболочечные вирусы с фузогенными белками (ВИЧ, коронавирусы) - могут сливаться непосредственно с плазматической мембраной клетки при нейтральном pH.

Вирусы с «шприцевым» механизмом (бактериофаг Т4) - имеют сложную структуру с хвостовыми волокнами, которые прикрепляются к бактерии, а затем хвостовой чехол сокращается, впрыскивая ДНК внутрь клетки.

Длинные гибкие вирусы (вирус табачной мозаики) - проникают через повреждения клеточной стенки растений.

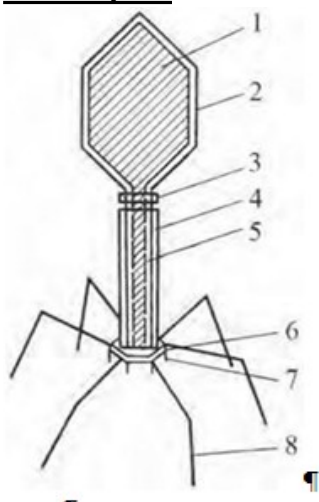
Задание 4. Заполнить таблицу «Методы исследования состава вириона»

Метод	Принцип	Информация о составе
Трансмиссионная ЭМ (ТЭМ)		
Крио-ЭМ		
Иммуно-ЭМ		

Вывод: таким образом, вирионы, несмотря на разнообразие форм и размеров, обладают общими структурными компонентами: генетическим материалом (ДНК или РНК) и белковой капсидной оболочкой, которая может дополняться липидной суперкапсидной (внешней) оболочкой у оболочечных вирусов. Форма и структура вириона эволюционировали для эффективного преодоления барьеров конкретного типа клеток-хозяев.

Задание на дом

Задания: 1. Соотнесите структурные элементы вириона и определите тип симметрии.



1. _____
2. _____
3. _____
4. _____
5. _____
6. _____
7. _____
8. _____

Тип симметрии: _____

Задание 2. Зарисовка и описание

Выполните схематичные рисунки 2–3 типов вирионов с подписями основных структурных элементов.

1. Что такое вирион?
2. Каковы основные функции капсида?
3. В чём разница между «голыми» и «оболочечными» вирусами?
4. Какие типы симметрии встречаются у вирионов? Приведите примеры.
5. Почему размеры вирусов измеряются в нанометрах?
6. Формы (стадии) существования вируса. (внеклеточная и внутриклеточная).
7. Каковы пределы размеров вирионов? Приведите примеры самых мелких и крупных вирусов.
8. Строение простых вирусов.
9. Строение сложных вирусов.
10. В чём преимущество икосаэдрической симметрии?

11. Чем отличается «голый» вирус от оболочечного? Как это влияет на их устойчивость?
12. Классификация вирусов по признакам: нуклеиновой кислоты, форме, способе размножения или патогенности.
13. Почему некоторые вирусы содержат ферменты в вирионе?
14. Как форма вириона связана с его способом проникновения в клетку?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 3 (1)

ВИРУСНЫЙ ГЕНОМ. ОНТОГЕНЕЗ ВИРУСОВ. ПРИКРЕПЛЕНИЕ ВИРИОНА К КЛЕТКЕ-ХОЗЯИНУ, ИЛИ АДСОРБЦИЯ. ТРАНСЛОКАЦИЯ ВИРИОНА. ПРОНИКНОВЕНИЕ И РАЗДЕВАНИЕ ВИРУСА

Цель работы: определить свойства и функции вирусного генома, исследовать различные стадии жизненного цикла вирусов – адсорбция, транслокация, проникновение, раздевание и их взаимодействие с клетками-хозяевами.

Ход работы:

Теоретическая часть

Все вирусные геномы являются гаплоидными, т.е. содержат одну копию каждого гена. Исключение составляют ретровирусы, которые обладают диплоидным геномом. Различают ДНК-содержащие и РНК-содержащие вирусы.

Задание 1. Заполнить таблицу «Ключевые особенности ДНК- и РНК-содержащих вирусов»

Критерий классификации	ДНК-содержащие вирусы	РНК-содержащие вирусы
Тип нуклеиновой кислоты		
Структура генома		
Место репликации		
Ключевые ферменты репликации		
Скорость мутаций		
Эволюционные аспекты		
Типичные представители		
Особенности жизненного цикла		
Теоретическое значение		

Теоретическая часть

Онтогенез вирусов: общая схема

Онтогенез (жизненный цикл) вируса включает последовательные стадии:

- *Адсорбция* или прикрепление к клетке-хозяину
- *Проникновение* вируса в клетку- доставка генома внутрь цитоплазмы (эндоцитоз, слияние мембран, инъекция)
- *Раздевание (депротеинизация)* и транспорт к месту репликации - освобождение нуклеиновой кислоты от капсида
- *Репродукция вируса*

- *Сборка вирионов*
- *Выход из клетки*

1. Адсорбция. Адсорбция вируса на мембране клетки является пусковым моментом в реализации его патогенных свойств. Для каждого вида вируса на мембране клеток существуют специфические рецепторы, с которыми вирусы связываются с помощью белков-антирецепторов. Узнавание клеточных рецепторов вирусными белками является высоко специфичным процессом. Вирусы используют рецепторы, предназначенные для прохождения в клетку необходимых для ее жизнедеятельности веществ: питательных веществ, гормонов, факторов роста и т.д. Рецепторы могут иметь разную химическую природу и представлять собой белки, углеводный компонент белков и липидов, липиды. Специфические рецепторы играют роль не только в прикреплении вирусной частицы к клеточной поверхности, но и определяют внутриклеточный транспорт и доставку вируса в определенные участки цитоплазмы и ядра. Наличие у клеток и вирусов соответствующих рецепторов лежит в основе органотропности.

2. Проникновение вируса в клетку. Проникновение вируса в клетку сопряжено с одновременным разрушением суперкапсидных и капсидных белков и высвобождением геномной нуклеиновой кислоты. Известны два механизма проникновения вируса в клетку. В основе первого лежит слияние суперкапсида вируса с мембраной клетки. Благодаря этому происходит высвобождение нуклеокапсида в цитоплазму с последующей реализацией свойств вирусного генома. Слияние мембран способны вызывать мембранные гликопротеины. Другой механизм получил название рецепторопосредованного эндоцитоза. С помощью рецепторного эндоцитоза вирусы захватываются в эндосомные везикулы (эндосомы). При этом нуклеиновая кислота вируса все еще остается отделенной от цитоплазмы двумя мембранами – вирусной и эндосомной. Эндосома сливается с лизосомой. Благодаря особым свойствам вирусных суперкапсидных белков происходит слияние липидных слоев суперкапсида и мембраны лизосомы, и выход вирусной нуклеиновой кислоты в цитоплазму клетки.

3. Раздевание вируса. После проникновения вируса в клетку происходит его раздевание, т. е. удаление капсида или его части клеточными или вирусными ферментами для дальнейшей экспрессии вирусных функций.

- *Место:* цитоплазма, эндосомы, ядро (для некоторых ДНК-вирусов).
- *Триггеры:*
 - Снижение pH в эндосоме (вирус гриппа)
 - Восстановительная среда цитоплазмы (разрыв дисульфидных связей)
 - Ферментативная деградация капсида (протеасомы, лизосомальные ферменты)
 - Взаимодействие с клеточными шаперонами (например, тепловой шок белков)

Раздевание сопровождается рядом характерных особенностей: исчезает инфекционная активность вируса, появляется чувствительность к нуклеазам, возникает устойчивость к действию антител. Конечными продуктами раздевания являются нуклеокапсиды или нуклеиновые кислоты.

Роль раздевания (uncoating) в жизненном цикле вирусов

Раздевание - процесс освобождения вирусного генома из белковой оболочки (капсида) и, при наличии, липидной оболочки (суперкапсида) — является **обязательной стадией для всех вирусов** по следующим фундаментальным причинам:

1. **Доступность генома для репликации и транскрипции:** Капсид физически блокирует доступ клеточных и вирусных ферментов (полимераз, транслаз) к нуклеиновой

кислоте. Только после раздевания геном становится субстратом для синтеза мРНК и репликации.

2. **Защита генома до момента доставки:** Капсид защищает геном от деградации нуклеазами в экстрацеллюлярной среде и цитозоле. Раздевание происходит **только после доставки** вируса в компартмент, где возможна экспрессия генома, что минимизирует риск деградации.

3. **Регуляция жизненного цикла:** Раздевание часто служит «молекулярным переключателем», запускающим последующие этапы инфекции. Его строгая локализация обеспечивает координацию с клеточными факторами, необходимыми для репликации.

Результат: образование «транскрипционно активного комплекса» -генома, готового к экспрессии.

4. Репродукция вируса. Репликация вирусного генома и синтез белков осуществляются с использованием клеточных ресурсов и вирусных ферментов. ДНК-вирусы (за исключением поксвирусов) реплицируются в ядре с участием вирусной ДНК-полимеразы; РНК-вирусы — в цитоплазме (ретровирусы проходят через ДНК-провирусную стадию с участием обратной транскриптазы). Трансляция вирусных мРНК происходит на рибосомах клетки; часто наблюдается каскадная экспрессия генов (ранние → поздние белки).

5. Сборка вирионов (морфогенез). Сборка капсида происходит путём самосборки капсомеров вокруг генома (или его упаковки через пору в прокапсиде с участием терминазы). Для вирусов с суперкапсидом — бутонирование нуклеокапсида через мембраны (плазматическую, ядерную, Гольджи), при этом происходит приобретение оболочки с встроенными вирусными гликопротеинами. Сборка строго координирована во времени и пространстве.

6. Выход из клетки. Безоболочечные вирусы — выходят при лизисе клетки (вирусные белки нарушают целостность мембран).

Оболочечные вирусы — покидают клетку путём бутонирования (budding) через плазмалемму или внутренние мембраны с последующей экзоцитозной доставкой; клетка может сохранять жизнеспособность (нелизогенный выход). Некоторые вирусы (напр., ВИЧ) используют механизмы отпочкования с участием клеточных белков ESCRT.

Таблица «Основные этапы вирусного репродуктивного цикла»

Этап	Ключевые процессы	Молекулярные механизмы	Зависимость от типа вируса
Адсорбция (прикрепление)	Специфическое распознавание и связывание вирусных поверхностных структур с рецепторами клетки-хозяина	• Вирусные адгезины (гликопротеины, капсидные белки) взаимодействуют с клеточными рецепторами (гликопротеины, гликолипиды, углеводные остатки) • Образование нековалентных связей • Конформационные изменения вирусных белков при связывании	Определяет тропизм вируса (тканевой, видовой) • Оболочечные вирусы: используют гликопротеины шипов • Безоболочечные: капсидные белки
Проникновение	Доставка генома в цитоплазму/ядро	• Вирусы без оболочки: эндоцитоз → лизис эндосомы (низкий pH) • Вирусы с оболочкой:	Оболочечные вирусы чаще используют слияние;

		слияние оболочки с мембраной или эндоцитоз + слияние	безоболочечные - преимущественно эндоцитоз
Раздевание (депротеинизация) и транспорт	Освобождение нуклеиновой кислоты от капсидных/оболочечных белков; транспортировка генома к месту репликации	Расщепление капсида/оболочки клеточными ферментами (протеазы, липазы) или изменением pH • Транспорт по цитоскелету (микротрубочки, актин) с участием динеина/кинезина • Транслокация через ядерную пору (у ДНК-вирусов) с участием импортинов	• Ядерные вирусы (аденовирусы, герпесвирусы): транспорт к ядру, использование ядерных локализационных сигналов (NLS) • Цитоплазматические вирусы (поксвирусы, ортомиксовирусы): репликация в цитоплазме • Ретровирусы: обратная транскрипция в цитоплазме → формирование преинтеграционного комплекса → транспорт в ядро
4. Репликация генома и транскрипция	Синтез вирусной нуклеиновой кислоты и мРНК	Зависит от класса по Балтимору (см. Табл. 2)	Ключевой этап, определяющий стратегию репродукции
5. Трансляция	Синтез вирусных белков	Использование клеточного трансляционного аппарата (рибосомы, тРНК, факторы элонгации)	Ранние белки (ферменты репликации) → поздние белки (структурные)
6. Морфогенез	Сборка зрелых вирионов	Самосборка капсида + упаковка генома (см. Табл. 3)	Отличается для простых и сложных вирусов
7. Выход	Высвобождение вирусного потомства	Лизис, почкование, экзоцитоз (см. Табл. 4)	Определяет цитопатический эффект и патогенез

«Два пути выхода вирусного потомства»

Задание 2. Заполните таблицу и сравните два механизма выхода вирусов из клетки:

Параметр	Лизис (разрушение клетки)	Почкование (без разрушения)
Примеры вирусов		
Влияние на клетку-хозяина		
Скорость выхода потомства		
Образование суперинфекции		
Роль клеточных		

мембран		
---------	--	--

Вопрос для размышления: Почему вирусы, использующие почкование, часто вызывают хронические инфекции? Ответ: почкование обеспечивает «тихий»,

Задание 2. «Анализ конкретного вируса»

☒ Вирус гепатита В

Опишите его жизненный цикл по плану:

1. Тип генома и структура вириона
2. Какие клетки-мишени поражает?
3. Где происходит репликация генома?
4. Как осуществляется морфогенез (сборка)?
5. Каким способом выходит из клетки?
6. Как этот механизм влияет на течение инфекции у человека/животного?

Задание на дом «Анализ ВПЧ» по схеме

Опишите его жизненный цикл по плану:

1. Тип генома и структура вириона
2. Какие клетки-мишени поражает?
3. Где происходит репликация генома?
4. Как осуществляется морфогенез (сборка)?
5. Каким способом выходит из клетки?
6. Как этот механизм влияет на течение инфекции у человека/животного?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 3 (2)

ВИРУСНЫЙ ГЕНОМ. ОНТОГЕНЕЗ ВИРУСОВ. ТИПЫ ВИРУС-КЛЕТОЧНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ: ПРОДУКТИВНАЯ, ОГРАНИЧЕННАЯ И АБОРТИВНАЯ ИНФЕКЦИИ

Цель работы: сформировать у студентов глубокое понимание молекулярных и клеточных механизмов, определяющих исход вирусной инфекции, и научиться классифицировать тип инфекции на основе экспериментальных данных.

Ход работы:

Теоретическая часть

1. Продуктивная инфекция (Productive Infection):

Суть: Вирус проникает в клетку, проходит все этапы репликации, собирает новые вирионы и выходит из клетки.

Исход для клетки: Лизис (при литической инфекции) или выживание с постоянной продукцией вируса (при хронической/персистентной инфекции).

Клетки: Permissive (пермиссивные).

Пример: Вирус гриппа в клетках эпителия дыхательных путей; Бактериофаг Т4 в *E. coli*.

2. Абортивная инфекция (Abortive Infection):

Суть: Вирус проникает в клетку, но репликационный цикл прерывается на ранних этапах (до репликации генома или синтеза белков). Продукция инфекционных вирионов не происходит.

Исход для клетки: Клетка выживает, но может измениться (трансформация) или стать резервуаром для персистирования.

Клетки: Непермиссивные (non-permissive).

Пример: Вирус SV40 в клетках человека (в отличие от клеток обезьян); Вирус бешенства в некоторых линиях фибробластов.

3. Ограниченная инфекция (Restricted Infection):

Суть: Промежуточный вариант. Вирусная ДНК/РНК может реплицироваться, некоторые белки синтезируются, но сборка полноценных вирионов блокирована или выход вируса ограничен факторами защиты клетки (рестрикция).

Механизм: Часто связана с работой клеточных факторов рестрикции (например, APOBEC, TRIM5α, интерфероновый ответ) или дефектностью вируса (DI-частицы).

Исход: Низкий титр вируса, длительное персистирование без массовой гибели клеток.

Задание 1. Заполните сравнительную таблицу, используя учебную литературу и теоретический брифинг.

Параметр сравнения	Продуктивная инфекция	Абортивная инфекция	Ограниченная инфекция
Проникновение вируса			
Репликация генома вируса			
Синтез вирусных белков			
Сборка вирионов			
Выход вируса из клетки			
Судьба клетки-хозяина			
Тип клеток			
Пример вируса			

Задание 2. Ситуационная задача: «Пермиссивность и Онкогенез»

Контекст: Известно, что вирус Папилломы Человека (ВПЧ) вызывает рак шейки матки. Однако в большинстве случаев инфицирования иммунная система элиминирует вирус, или инфекция протекает латентно.

Вопросы для обсуждения (письменный ответ):

1. Какой тип инфекции характерен для ВПЧ в дифференцированных клетках эпителия (продукция вирионов)?
2. Почему абортивная инфекция ДНК-содержащих вирусов чаще приводит к онкогенной трансформации, чем продуктивная инфекция? (Подсказка: вспомните интеграцию вирусного генома).
3. Объясните феномен «хозяин-специфичности» на примере вируса полиомиелита (размножается в клетках человека, но не в клетках мыши, кроме трансгенных). К какому типу инфекции относится взаимодействие «Вирус полиомиелита + Клетка мыши»?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 4 (1,2).

ТИПЫ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ. ЕСТЕСТВЕННАЯ ЗАЩИТА ОТ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ. СИСТЕМА РЕСТРИКЦИИ/МОДИФИКАЦИИ.

СИСТЕМА CRISPR/CAS

Цель работы: Изучить классификацию вирусных инфекций по характеру взаимодействия вирус-хозяин, механизмы естественной противовирусной защиты на клеточном и организменном уровнях, а также молекулярные системы защиты прокариот от чужеродной нуклеиновой кислоты (рестрикция/модификация и CRISPR/Cas).

Ход работы:

Теоретическая часть

Типы вирусных инфекций

В зависимости от исхода взаимодействия вируса с клеткой-хозяином выделяют следующие типы инфекций:

Ключевое различие: Лизогения характерна для бактериофагов (интеграция в бактериальную хромосому), латентность — для эукариотических вирусов (персистенция в ядре без интеграции или с ней).

Естественная защита от вирусных инфекций

Врождённый иммунитет (неадаптивный)

Физические и химические барьеры: кожа, слизистые оболочки, лизоцим слёз, кислая среда желудка.

Интерфероны (ИФН):

ИФН- α/β (тип I): индуцируются в инфицированных клетках, активируют JAK-STAT-сигнализацию в соседних клетках → экспрессия белков (PKR, OAS, Mx) блокирующих трансляцию вирусной РНК и репликацию.

ИФН- γ (тип II): секретируется Т-лимфоцитами и NK-клетками, усиливает антигенпрезентацию и активность макрофагов.

NK-клетки (естественные киллеры): распознают клетки с пониженной экспрессией МНС I (часто при вирусной инфекции) и индуцируют апоптоз через перфорины/гранзимы.

РНК-интерференция (у растений и беспозвоночных): клеточные Dicer-ферменты расщепляют вирусную РНК на короткие интерферирующие РНК (siRNA), направляющие RISC-комплекс к деградации комплементарных вирусных РНК.

Апоптоз инфицированных клеток: запускается через внутренний (митохондриальный) или внешний (рецепторный) пути для ограничения распространения вируса.

Адаптивный иммунитет

Гуморальный ответ: продукция нейтрализующих антител против вирусных поверхностных антигенов (блокируют адсорбцию/проникновение).

Клеточный ответ: цитотоксические CD8⁺ Т-лимфоциты распознают вирусные пептиды на МНС I и уничтожают инфицированные клетки.

Система рестрикции/модификации (R/M) у прокариот

Функция: Защита бактерий от бактериофагов и горизонтального переноса генов путём расщепления чужеродной ДНК.

Механизм:

Модификация: Метилтрансфераза (метилаза) специфически метилирует аденин или цитозин в палиндромных последовательностях собственной ДНК (напр., 5'-GATC-3' → 5'-G^{m6}ATC-3').

Рестрикция: Рестриктаза распознаёт неметилированную последовательность в чужеродной ДНК (фаговой) и разрезает её.

Система CRISPR/Cas

История открытия:

1987 г. — обнаружены странные повторяющиеся последовательности в геноме *E. coli* (Ishino et al.).

2005 г. — гипотеза об адаптивной функции (Можеc, Болотин).

2007 г. — экспериментальное подтверждение защиты от фагов (*Streptococcus thermophilus*, Barrangou et al.).

2012 г. — адаптация для генной инженерии (Doudna, Charpentier).

Биологическое значение:

- Адаптивная иммунная система прокариот с «памятью».
- Динамическая эволюция: спейсеры отражают историю контактов с фагами.
- Антагонистическая коэволюция: фаги мутируют PAM или спейсерные последовательности для эвазии.

Биотехнологическое применение:

- Геномное редактирование (нокауты, точечные мутации, вставки).
- Эпигенетическое редактирование (dCas9-репрессоры/активаторы).
- Диагностика (SHERLOCK, DETECTR на основе Cas13/Cas12).

Контрольные вопросы для самопроверки

1. В чём принципиальное различие между лизогенной и латентной инфекцией? Приведите примеры вирусов для каждого типа.
2. Как интерфероны типа I обеспечивают противовирусное состояние в соседних клетках? Назовите три ключевых белка-эффектора интерфероновой реакции.
3. Почему система рестрикции/модификации не разрушает собственную ДНК бактерии? Какую роль играет метилирование?
4. Сравните механизмы адаптации в системах рестрикции/модификации и CRISPR/Cas. Какая из систем обладает «памятью»?
5. Что такое PAM (Protospacer Adjacent Motif) и почему он необходим для функционирования системы CRISPR/Cas9?
6. Какие типы систем CRISPR/Cas используются для редактирования генома? Как это может применяться против геном-содержащих вирусов?
7. Объясните эволюционное преимущество наличия у бактерий нескольких систем защиты (R/M, CRISPR, abortive infection).

Задания на дом

Схематическое задание: Нарисуйте цикл лизогенной инфекции бактериофага λ с указанием ключевых регуляторных белков (CI, Cro) и условий индукции.

Анализ данных: Представлены последовательности спейсеров из CRISPR-локуса *S. thermophilus*. Определите, против каких фагов сформирован иммунитет (используйте BLAST-анализ in silico).

Сравнительная таблица: Составьте таблицу «Сравнение систем защиты прокариот от фагов» (рестрикция/модификация, CRISPR/Cas, системы abortive infection, retrons) по критериям: механизм, наличие памяти, скорость ответа, энергозатраты.

Кейс-стади: Вирус герпеса устанавливает латентную инфекцию в ганглиях. Какие механизмы позволяют вирусу избегать иммунного надзора в латентной фазе? Какие факторы могут спровоцировать реактивацию?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 5 (1)**РНК-САЙЛЕНСИНГ**

Цель работы: получить глубокое понимание биологического процесса РНК-сайленсинга и его влияние на иммунный ответ.

Ход работы:**Теоретическая часть**

РНК-сайленсинг (англ. RNA silencing; от англ. silencing — принуждение к молчанию, затыкание рта) играет главную роль в индуцибельной защите клеток растений от паразитического проникновения чужеродных генов, в частности вирусных. Этот регуляторный процесс приводит к подавлению экспрессии вирусных генов и основан на системе РНК-интерференции с участием малых некодирующих РНК — продукта нуклеолитического процессинга dsРНК. Система РНК-интерференции имеется у

большинства эукариотов; она отсутствует только у некоторых протистов, аскомицетов и базидиомицетов, видимо, в результате вторичной потери.

Появляясь в цитоплазме эукариотной клетки эндогенная или экзогенная dsРНК расщепляется на **малые РНК, или sРНК** (англ. small RNA, sRNA), — короткие фрагменты длиной 21–24 п.н., на 3'-концах обеих нитей которых имеются 2-нуклеотидные «навесы».

Эндонуклеазное расщепление осуществляется с помощью **дайсер-фермента** (англ. Dicer enzyme; от англ. dice — нарезать кубиками), который относится к молекулярному семейству РНКазы III. РНК-связывающий эффекторный белок RDE-4 или R2D2 доставляет одну из нитей малой РНК к комплексу RISC (сокр. англ. RNA-induced silencing complex), который обеспечивает ее взаимодействие с комплементарной последовательностью РНК или ДНК.

Результатом такого взаимодействия становится изменение активности генов, или **РНК-интерференция** (RNA-interference, RNAi; от англ. interference — вмешательство, препятствие).

Таким образом, РНК-сайленсинг — это комплекс процессов, при которых dsРНК вызывает РНК-интерференцию. РНК-сайленсинг может осуществляться как на уровне РНК, так и на уровне ДНК. В первом случае нарушается стабильность транскрипта или подавляется трансляция (посттранскрипционный сайленсинг; англ. **post-transcriptional gene silencing**, PTGS); во втором случае происходит эпигенетическая модификация ДНК (транскрипционный сайленсинг; англ. **transcriptional gene silencing**, TGS; **RNA-induced transcriptional silencing**, RITS).

Малые РНК, которые могут быть как эндогенного, так и экзогенного происхождения, подразделяются на две группы — **малые интерферирующие РНК**, или siРНК (англ. small interfering RNA, siRNA), и **микро-РНК**, или miРНК (англ. microRNA, miRNA). Они различаются способом образования и спецификой механизма интерференции, хотя используются одним и тем же комплексом RISC.

Роль РНК-сайленсинга в антивирусном иммунитете. Источником siРНК могут быть репликативные интермедиаты РНК-содержащих вирусов. В случае ДНК-содержащих вирусов это продукты двунаправленной транскрипции повторяющихся геномных последовательностей.

Аппарат сайленсинга распознает dsРНК и обеспечивает синтез малых РНК, которые вызывают вирус-индуцированный сайленсинг генов (англ. **virus-induced gene silencing**, VIGS). Это приводит к подавлению размножения инфекционного агента; в случае вирусов растений — по причине эндонуклеазного расщепления РНК с помощью комплекса RISC.

Антивирусный РНК-сайленсинг у растений. Еще задолго до объяснения механизма РНК-интерференции было установлено, что индуцированный вирусной РНК сайленсинг вирусных генов распространяется по растению из зоны первичного заражения, а также может быть передан при прививке. В настоящее время показано, что после образования siРНК передается между клетками по плазмодесмам. Наряду с этим существует еще не идентифицированный сигнал для запуска сайленсинга, обеспечивающий его системное распространение.

Антивирусный РНК-сайленсинг у растений можно подразделить на две стадии — **инициацию и поддержание**. Для инициации необходимо появление dsРНК, которая распознается дайсер-ферментом с последующим рекрутированием комплекса RISC, что приводит к образованию siРНК. Поддержание связано с отсутствием dsРНК в качестве триггера; siРНК амплифицируются с помощью РНК-зависимой РНК-полимеразы. При этом ранее образованная siРНК служит праймером, а гомологичная ей клеточная РНК — матрицей.

РНК-сайленсинг находит практическое применение при защите растений от вирусной инфекции. Путем введения генетических конструкций, инициирующих PTGS, трансгенные культивируемые растения удается защитить от широкого круга вирусных

инфекций. В частности, так было спасено производство папайи (*Carica papaya*) на Гавайских о-вах, которое ранее несло значительный ущерб от фитовируса *Papaya ringspot virus* (PRSV; сем. *Potyviridae*).

Антивирусный РНК-сайленсинг у животных. В отличие от растений, животные образуют меньше вариантов дайсер-ферментов; тем не менее, у некоторых животных антивирусный иммунитет также связан с РНК-интерференцией. Примером служит иммунитет личинок и взрослых особей дрозофилы против вируса Х (*Drosophila X virus*, DXV; сем. *Birnaviridae*).

Участие РНК-интерференции в антивирусном иммунитете у млекопитающих окончательно не доказано. В то же время существует возможность использования РНК-интерференции при лечении ряда вирусных заболеваний человека (гепатитов, гриппа, приобретенного иммунодефицита и др.).

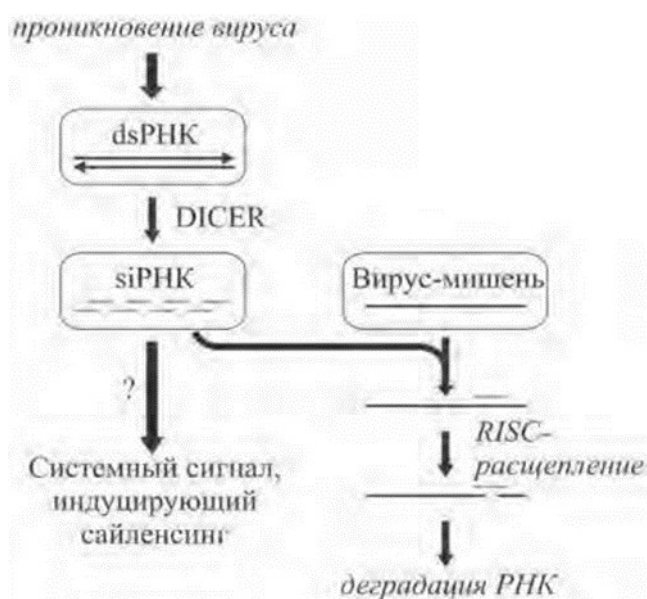
Вирусная супрессия РНК-сайленсинга. Для противодействия защитному механизму РНК-интерференции большинство вирусов растений образует белки-супрессоры РНК-сайленсинга, которые позволяют их обладателю беспрепятственно размножаться в специфическом хозяине.

Супрессоры РНК-сайленсинга, которые используют как РНК-содержащие, так и ДНК-содержащие вирусы растений, весьма разнообразны по структуре кодирующей последовательности и механизму действия, что свидетельствует об их независимом эволюционном происхождении.

К числу изученных супрессоров сайленсинга у вирусов растений относятся: 1) белок P1/HC-Pro вирусов рода *Potyvirus* (сем. *Potyviridae*), влияющий на сборку комплекса RISC; 2) белок 2b вирусов рода *Cucumovirus* (сем. *Bromoviridae*) и белок p25 вирусов рода *Potexvirus* (сем. *Alphaflexiviridae*), препятствующие распространению сигнала сайленсинга; 3) белок p19 вируса рода *Tombusvirus* (сем. *Tombusviridae*), непосредственно связывающий siРНК; 4) белок CP вирусов рода *Carmovirus* (сем. *Tombusviridae*), препятствующий процессингу dsРНК.

Первый супрессор сайленсинга у вирусов животных, белок B2, был обнаружен у вируса насекомых — *Flock house virus* (FHV; сем. *Nodaviridae*). Позднее к нему добавились белок E3L вируса *Vaccinia virus* (сем. *Poxviridae*), белок NS1 вируса *Influenzavirus A* (сем. *Orthomyxoviridae*) и белок Tas вируса *Primate foamy virus type 1* (PFV-1; сем. *Retroviridae*).

Задание 1. Зарисуйте и объясните этапы РНК-сайленсинга при инактивации фитовируса.



Задание 2. Изучите влияние РНК-сайленсинга на репликацию вируса.

1. Изолируйте и культивируйте исследуемые клетки;

2. Заразите клетки вирусом и отслеживайте репликацию вируса с течением времени;
3. Введите агенты подавления РНК (такие как малые интерферирующие РНК) в инфицированные клетки, чтобы заглушить определенные гены, участвующие в репликации вируса;
4. Наблюдайте за эффектом РНК-сайленсинга на репликацию вируса;
5. РНК-сайленсинг должен приводить к снижению репликации вируса, а также к усилению индукции апоптоза в инфицированных клетках.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 5 (2) **АПОПТОЗ, ИНДУЦИРОВАННЫЙ ВИРУСАМИ. АНТИВИРУСНОЕ** **ДЕЙСТВИЕ ИНТЕРФЕРОНА.**

Цель работы: рассмотреть процесс апоптоза, индуцированный вирусами, исследовать антивирусное действие и функции интерферонов.

Ход работы:

Теоретическая часть

Самоубийство клетки, или ее запрограммированная смерть (англ. programmed cell death), — это цитологический феномен, при котором избирательному разрушению подвергаются клетки, по той или иной причине оказавшиеся дефектными, в том числе в результате заражения вирусами.

Апоптоз. Запрограммированная смерть клетки сопровождается комплексом морфологических изменений, который называется апоптозом (греч. apoptosis — устранение). Вопреки обычному мнению, выражение «запрограммированная смерть клетки» и термин «апоптоз» не являются взаимозаменяемыми, поскольку в первом случае речь идет о более широком круге явлений.

Термин «апоптоз», предложенный в 1972 г. английским физиологом Джоном Керром (J. F. R. Kerr), традиционно используется применительно к запрограммированной смерти клетки у ядерных организмов, особенно многоклеточных.

К числу **морфобиохимических признаков апоптоза** относятся:

1) изменение размера клетки, которая разбухает или, наоборот, сморщивается; 2) образование хроматиновых конгломератов на периферии нуклеоплазмы; 3) дегенерация цитоплазмы, сопровождающаяся усиленной грануляцией; 4) блеббинг, или отпочкование везикул от цитоплазматической мембраны; 5) разрушение хромосомной ДНК с образованием «лестницы» фрагментов, длина которых кратна размеру нуклеосомного участка, т. е. 180–200 п.н. Важно отметить, что деградация ДНК не служит причиной смерти клетки, поскольку апоптозу могут подвергаться и клетки с удаленным ядром.

Апоптоз не является реакцией на экзогенное повреждение клетки; иными словами, он соответствует физиологической, или эндогенной, смерти клетки. Этим он отличается от некроза (греч. necrosis — смерть), или патологической смерти, вызванной внешним повреждающим воздействием. Мембраны при апоптозе, в частности мембрана лизосомы, остаются интактными, и его завершающей фазой служит распад клетки с образованием «апоптозных телец», которые поглощаются макрофагами; содержимое мертвой клетки не выходит наружу, что исключает развитие воспаления. При некрозе, напротив, лизосомы разрушаются; содержимое клетки выходит наружу, вызывая воспаление. Таким образом, в отличие от апоптоза, при некрозе повреждаются соседние клетки.

Апоптоз включает в себя **четыре основные фазы**: 1) поступление проапоптозного сигнала эндогенной либо экзогенной природы, или рецепторная фаза; 2) процессинг сигнала с запуском регуляторного ответа, или фаза принятия решения о смерти (англ. commitment); 3) осуществление характерных морфобиохимических изменений, или эффекторная фаза; 4) деградация генетического материала и распад клетки с образованием апоптозных телец, которые поглощаются макрофагами, или постмортальная фаза.

Апоптоз клеток, зараженных вирусом. В отдельных случаях в зараженных клетках (в цитоплазме или в протеасомах) происходит протеолиз вирусных белков. Образовавшиеся пептиды связываются транспортными белками ТАР (сокр. англ. **transporter associated with antigen processing**). Комплекс ТАР/пептид поступает в эндоплазматический ретикулум, где пептид передается молекуле главного комплекса гистосовместимости МНС-I. В ассоциации с МНС пептид покидает эндоплазматический ретикулум и через аппарат Гольджи доставляется к цитоплазматической мембране, в результате чего вирусные эпитопы презентуются на ее наружной поверхности.

Затем в дело вступают цитотоксические Т-лимфоциты CD8⁺. Их поверхностные TCR-рецепторы (сокр. англ. **T cell receptor**) распознают вирусные эпитопы на клетке-мишени, что служит стимулом для образования двух лимфоцитарных белков — GrA/B (сокр. англ. **granzyme**; от **granule enzyme** — фермент цитоплазматических гранул) и перфорина (англ. **perforin**).

При связывании комплекса МНС-I/пептид с поверхностным рецептором TCR в ядро Т-лимфоцита поступает регуляторный сигнал для синтеза белка FasL (сокр. англ. **Fas ligand**; 40 кДа). Белок-лиганд FasL встраивается в цитоплазматическую мембрану Т-лимфоцита, а затем вступает во взаимодействие с рецептором Fas (сокр. англ. **factor of apoptosis stimulus**; CD95), расположенным на поверхности клетки-мишени.

Когда белок-лиганд FasL связывается с мембранным рецептором Fas, в клетке-мишени запускается сигнальный каскад, который приводит к превращению прокаспазы в каспазу. В нем участвуют DD-домены рецептора (сокр. англ. **death domain** — домен смерти), DD-домены цитоплазматического адапторного белка FADD (сокр. англ. **Fas-associated death domain**) и прокаспаза.

N-концевой домен белка FADD играет роль «эффекторного домена смерти» (англ. **death effector domain**, DED). Такие же DED-домены имеются в составе удаляемого фрагмента прокаспазы. В результате гетеродимеризации этих доменов прокаспаза иммобилизуется на цитоплазматической мембране и автокаталитически превращается в каспазу (К числу мишеней, которые разрушаются каспазами на эффекторной фазе апоптоза, относятся белки ядерной ламина и цитоплазматического цитоскелета; белки сплайсосомы; белки, отвечающие за репарацию и прохождение клеточного цикла, и другие).

Антивирусное действие интерферона. Одной из форм ответа на вирусную инфекцию служит изменение паттерна транскрипции хозяйских генов. Это происходит либо в результате прямой активации транскрипционных факторов, либо опосредованно — когда в ответ на вторжение вируса клетки позвоночных (в частности, млекопитающих и птиц) синтезируют низкомолекулярные регуляторные белки **интерфероны**.

У млекопитающих в результате вирусной инфекции развивается иммунный ответ, при котором активируется синтез интерферонов, ограничивающих вирусную репродукцию (см. ниже).

Антивирусный сигнальный путь начинается с того, что клетка-хозяин регистрирует событие инфекции по присутствию «визитной карточки» вируса — вирусной нуклеиновой кислоты (dsДНК, ssРНК или dsРНК). За это отвечают хозяйские **паттернраспознающие рецепторы** (англ. **pattern recognition receptor**, PRR), которые связаны с клеточными мембранами или имеют цитоплазматическую локализацию.

Интерферон не токсичен для клеток и не является антивирусным агентом прямого действия, а вызывает в клетке «антивирусное состояние» за счет индукции защитных механизмов.

Будучи сигнальными молекулами, интерфероны обладают исключительно высокой биологической активностью; для того, чтобы привести клетку в «антивирусное состояние» достаточно нескольких десятков молекул этого эффектора.

При связывании интерферонов I типа с димерным рецептором IFNAR1/IFNAR2 его цитоплазматические домены активируют «нерецепторные» протеинкиназы JAK1 и JAK2.

Сокращенные английские названия этих ферментов имеют две расшифровки: **just another kinase** — очередная киназа (*т. е. представитель большого числа киназ, выявленных с помощью PCR-реакции*) и **Janus kinase** — Янус-киназа (*ссылка на двуликого римского бога Януса; фермент содержит два почти идентичных фосфат-связывающих домена, первый обладает киназной активностью, второй ее регулирует*).

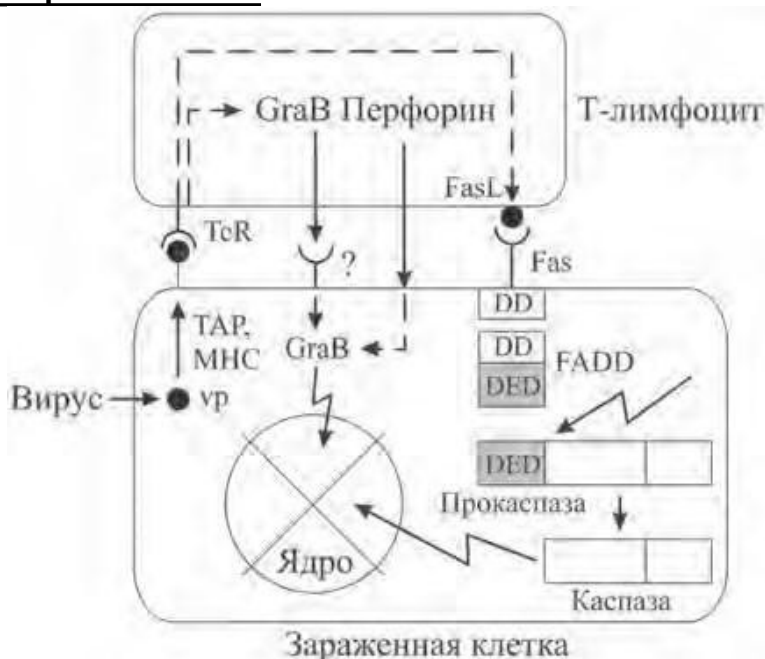
Протеинкиназы, активированные путем автофосфорилирования по остаткам Тyр, фосфорилируют цитоплазматические транскрипционные факторы STAT1 и STAT2

(сокр. англ. **signal transducer and activator of transcription 1 & 2**).

Фосфорилированные факторы STAT1~P и STAT2~P образуют гомо- и гетеродимеры, к которым дополнительно присоединяется транскрипционный фактор IRF9 (сокр. англ. **interferon-regulated factor 9**; синоним — ISGF3γ). Образовавшийся тройственный комплекс, получивший название ISGF3 (сокр. англ. **interferon-stimulated gene factor, 3-meric**), переносится из цитоплазмы в клеточное ядро.

Благодаря взаимодействию между отдельными комплексами ISGF3 и консенсусными хромосомными последовательностями ISRE (сокр. англ. **IFN-stimulated response element**), расположенными в промоторных участках >100 генов группы ISG (сокр. англ. **IFN stimulated gene**), эти гены начинают транскрибироваться. Комбинированные димеры STAT-факторов также связываются с GAS-элементами (сокр. англ. **gene-activating site**) в промоторных участках других хромосомных генов.

Задание 1. Используя лекционный и дополнительный материалы, объясните процесс апоптоза на изображении ниже.



Апоптоз зараженной клетки при посредстве Т-лимфоцита.

Задание 2. Изучить влияние интерферонов в инфицированных клетках.

1. Изолировать и культивировать изучаемые клетки.
2. Заразите клетки вирусом и отслеживайте репликацию вируса с течением времени.
3. Обработайте инфицированные клетки интерфероном, чтобы активировать механизмы противовирусной защиты.
4. Оцените влияние лечения интерфероном на репликацию вируса и индукцию апоптоза в инфицированных клетках.
5. Сравните результаты с контрольными клетками (не обработанными агентами, подавляющими РНК, или интерфероном), чтобы определить влияние этих биологических процессов на репликацию вируса и индукцию апоптоза.

6. Лечение интерфероном должно приводить к дальнейшему снижению репликации вируса и усилению индукции апоптоза в инфицированных клетках, демонстрируя противовирусное действие интерферона.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 6 (1) **СИСТЕМАТИКА И БИОРАЗНООБРАЗИЕ ВИРУСОВ. РОЛЬ ВИРУСОВ В** **ЭКОСИСТЕМАХ**

Цель работы: познакомиться с основными классификациями вирусов. Изучить роль вирусов в экосистемах.

Ход работы:

Теоретическая часть

Вирусы – уникальные биологические сущности, занимающие пограничное положение между живой и неживой природой. Несмотря на микроскопические размеры и элементарную организацию, они играют ключевую роль в экосистемах планеты, эволюции живых организмов и даже в глобальных биохимических циклах.

Вирусы – самые многочисленные биологические объекты на Земле, которые демонстрируют беспрецедентное генетическое разнообразие. Главными источниками этого разнообразия является высокая частота мутаций, рекомбинация геномов и горизонтальный перенос генов между вирусами и хозяевами.

Объектом систематики вирусов служит их биоразнообразие. В настоящее время оно охарактеризовано крайне неравномерно, в частности, из-за непропорционального финансирования исследований «высоко актуальных» и «мало актуальных» групп вирусов.

По этой причине лучше всего охарактеризованы вирусы человека и животных, а также бактериофаги, которые используются в молекулярной биологии в качестве одного из модельных объектов. Примером слабоизученных вирусов могут служить вирусы грибов (за исключением нескольких промышленно выращиваемых съедобных видов), вызывающие латентные инфекции.

Задание 1. Заслушать рефераты по теме «Влияние вирусов на биосферу»:

1. Роль вирусов в регуляция популяций бактерий, растений и животных.
2. Роль вирусов в биогеохимических циклах.
3. Примеры симбиоза в экосистеме.

Теоретическая часть

История классификации вирусов отражает постепенное накопление знаний о их природе, структуре и механизмах функционирования. Первые попытки систематизации вирусов появились в начале XX века, а современные подходы сформировались благодаря развитию молекулярной биологии и генетики.

В 1971 году американский учёный Дэвид Балтимор предложил классификацию, основанную на различиях генетических систем вирусов в отношении способа синтеза смысловой мРНК. В ней учитываются тип геномной нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК), количество цепочек в геномной нуклеиновой кислоте (одноцепочечная или двухцепочечная), а также направление цепи в случае с вирусами, генетический материал которых представлен одноцепочечной РНК. Изначально система включала шесть групп, позже была расширена до семи после открытия вирусов dsDNA-RT.

Балтиморская классификация в основном основана на способе транскрипции вирусного генома, и вирусы в каждой группе обычно имеют схожий механизм синтеза мРНК. Хотя это и не является основным критерием балтиморской классификации, группы организованы таким образом, что вирусы в каждой из них обычно имеют схожие механизмы репликации вирусного генома. Структурные характеристики внеклеточной вирусной частицы, называемой вирионом, такие как форма вирусного капсида, в котором хранится геном, и наличие вирусной оболочки, липидной мембраны, окружающей капсид, не имеют прямого отношения к балтиморским группам, как и генетическое родство этих групп, основанное на эволюционной истории.

Классификация по Балтимору стала широко использоваться наряду с таксономией вирусов, регулируемой Международным комитетом по таксономии вирусов (ICTV).

Международный комитет по таксономии вирусов (ICTV) был создан для разработки, уточнения и поддержания универсальной таксономии вирусов. Комитет использует модифицированную систему биологической систематики, включая такие таксоны, как порядок, семейство, подсемейство, род и вид.

С 1971 года ICTV публикует отчёты о таксономии вирусов, в которых подробно описываются все таксоны, включая структуру вирусов, строение генома, биологические свойства и филогенетику.

В 2018 и 2019 годах ICTV частично интегрировал балтиморскую классификацию в таксономию, учитывая доказательства общего происхождения некоторых групп вирусов. В 2016 году комитет начал рассматривать вопрос об установлении рангов выше порядка, а в ходе голосований в 2018 и 2019 годах ввёл систему из 15 рангов – от реалма до вида. Классификация ICTV не регулирует подвиды, штаммы и изоляты.

Развитие методов секвенирования в XXI веке позволило более детально изучить эволюцию и разнообразие вирусов, что способствовало дальнейшему совершенствованию таксономии.

Названия вирусов могут быть научными, а также тривиальными, т. е. профессионально-жаргонными; последние правилами ICTV не признаются.

Во всех случаях, согласно рекомендации ICTV, официальное название вида вируса является: 1) бинарным; 2) английским, частично латинизированным.

Задание 2. Рассмотреть и обсудить классификацию по Балтимору

Группа I: вирусы с двухцепочечной ДНК (dsДНК)

Группа II: одноцепочечные ДНК-вирусы (ssДНК)

Группа III: вирусы с двухцепочечной РНК (dsРНК)

Группа IV: одноцепочечные РНК-содержащие вирусы с положительным смыслом (+ssРНК)

Группа V: одноцепочечные РНК-вирусы с негативной цепью (–ssРНК)

Группа VI: одноцепочечные РНК-содержащие вирусы с промежуточным этапом в виде ДНК в жизненном цикле (ssRNA-RT)

Группа VII: двухцепочечные ДНК-вирусы с промежуточной РНК в жизненном цикле (dsДНК-РНК)

Задание 3. Рассмотреть и записать схему таксономических рангов Международного комитета по таксономии вирусов (ICTV) (2019 г.)

Реалм (-viria) и субреалм (-vira)

Царство (-virae) и подцарство (-virites)

Тип (-viricota) и подтип (-viricotina)

Класс (-viricetes) и подкласс (-viricetidae)

Порядок (-virales) и подпорядок (-virineae)

Семейство (-viridae) и подсемейство (-virinae)

Род (-virus) и подрод (-virus)

Вид (-virus)

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 6 (2) ПРОИСХОЖДЕНИЕ И ЭВОЛЮЦИЯ ВИРУСОВ

Цель работы: изучить основные гипотезы происхождения вирусов и понятие об эволюции.

Ход работы:

Теоретическая часть

Происхождение вирусов остаётся одной из самых интригующих проблем биологии. Ни одна из существующих гипотез не даёт полного объяснения, но совокупность данных

указывает на древность вирусных форм жизни; их ключевую роль в эволюции биосферы; множественность путей возникновения разных групп вирусов.

Дальнейшие исследования в области вирусологии, геномики и синтетической биологии помогут пролить свет на эту загадку и углубить понимание фундаментальных процессов жизни.

Задание 1: Обсудите основные гипотезы происхождения вирусов и отметьте их основные особенности.

Гипотеза	Основная идея	Ключевые особенности	Слабые места
Регрессивная (редукционная)	Вирусы произошли от свободноживущих клеточных предков (бактерий/архей), ставших внутриклеточными паразитами	• Потеря клеточных структур в процессе паразитизма • Подтверждается сходством крупных вирусов (мимивирусы) с бактериями	• Не объясняет происхождение РНК-вирусов • Нет прямых доказательств перехода от клетки к вирусу
Гипотеза клеточного происхождения (сбежавших генов)	Вирусы возникли из мобильных генетических элементов (плазмид, транспозонов)	• «Самостоятельные» гены приобрели капсид и способность к межклеточному переходу • Объясняет сходство вирусных геномов с клеточными мобильными элементами	• Не объясняет сложность капсидов и других вирусных структур • Неясно, как «беглые гены» приобрели способность инфицировать клетки
Гипотеза доклеточного происхождения (гипотеза о вирусах прародителях)	Вирусы существовали с момента зарождения жизни, произойдя из самореплицирующихся РНК/ДНК молекул	• Возникновение в «мире РНК» до появления клеток • Долгая параллельная эволюция с клеточными организмами	• Отсутствие ископаемых доказательств • Сложно реконструировать ранние этапы эволюции
Гипотеза о химерном происхождении вирусов	Разные группы вирусов имеют разное происхождение	• Нет единого предка для всех вирусов • ДНК- и РНК-вирусы могли возникнуть независимо разными путями	• Не объясняет появление капсида и других компонентов вирусной частицы • Не объясняет наличие у большинства вирусов специфических генов, которые отсутствуют у клеточных организмов

Теоретическая часть

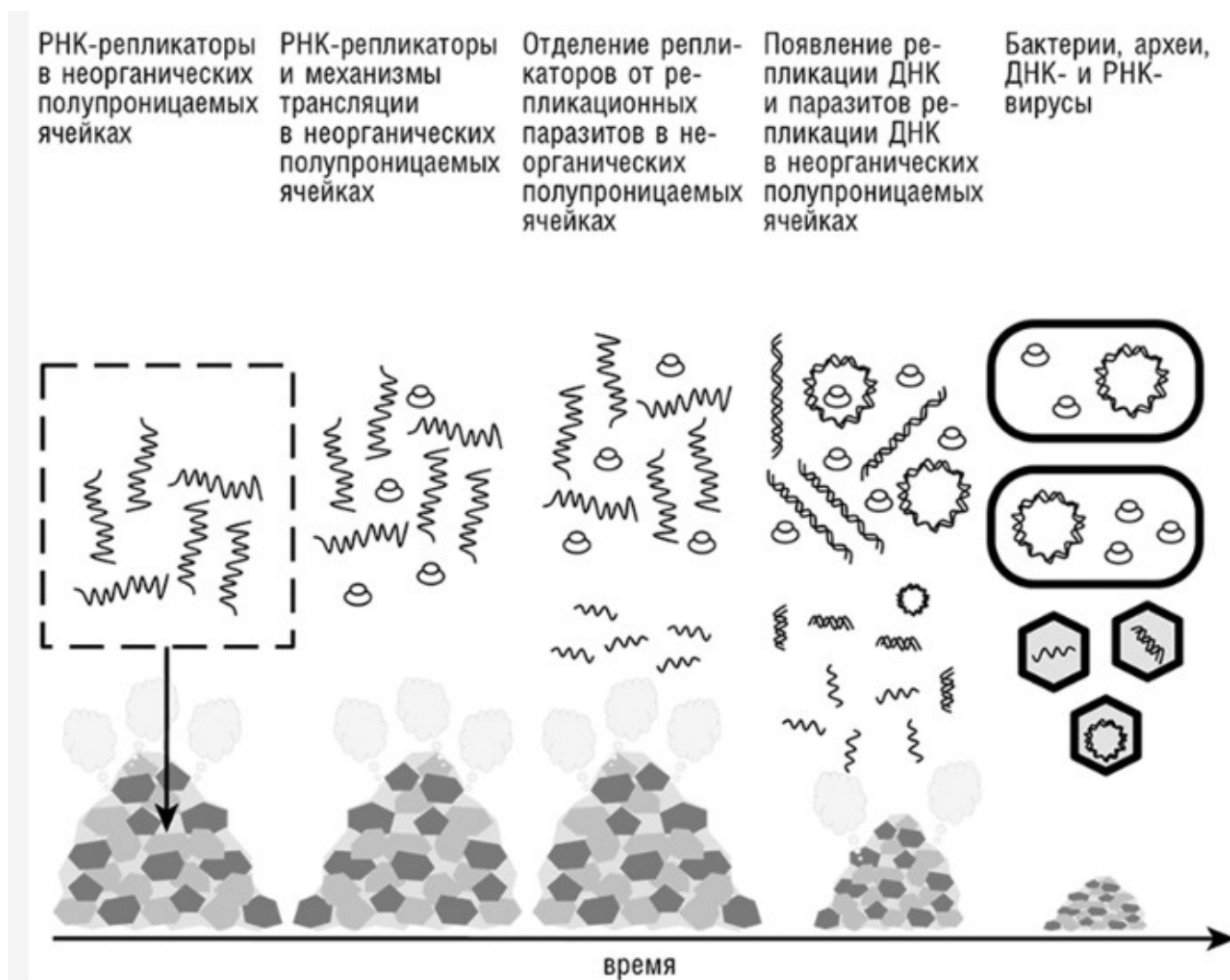
Предполагается, что идеальные условия для формирования жизни существовали вблизи термальных геоисточников (морских или наземных) в виде сети неорганических ячеек,

обеспечивающих градиенты температуры и pH, способствующих первичным реакциям, и предоставляющих универсальные каталитические поверхности для примитивной биохимии [10].

Эти отсеки могли быть населены разнородной популяцией генетических элементов. Вначале сегментами РНК. Затем более крупными и сложными молекулами РНК (один или несколько белок-кодирующих генов). А позднее и сегментами ДНК, которые постепенно увеличивались (рис. 3).

Такие простейшие генетические системы использовали неорганические соединения из раствора и продукты деятельности других генетических систем. Сначала они должны были подчиняться индивидуальному отбору ввиду большого разнообразия. Но ясно, что важным фактором такого отбора была способность передавать генетическую информацию, то есть, копировать себя. Присутствие одновременно в одной ячейке молекул, способных копировать РНК, кодировать полезные белки и управлять синтезом новых молекул, давало больше шансов выживать в каждой отдельной ячейке. И в такой системе рано или поздно должны были появиться паразитирующие элементы. А если это так, то вирусные элементы стоят у самых истоков эволюции.

Задание 2: Рассмотреть сценарий вирусного мира в гипотезе доклеточного происхождения вирусов



Теоретическая часть

Если рассматривать эволюцию как единый процесс, становится понятно, что виды никогда не эволюционируют независимо друг от друга. Чтобы поддержать свое существование в постоянно эволюционирующем мире, вид должен реагировать на

эволюционные изменения и должным образом приспосабливаться к среде. Поэтому, если мы говорим о вирусах как о паразитах, мы обязаны представлять себе взаимоотношения вируса с хозяином. В борьбе с вирусом хозяева развивают новые защитные механизмы, а паразиты отвечают, развивая механизмы для атаки и взлома защиты. Этот процесс может длиться бесконечно либо до вымирания одной из противоборствующих сторон. Так множественные системы защиты составляют существенную часть геномов всех клеточных организмов, а взлом защиты — одна из основных функций генов у вирусов с большими геномами

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 7 (1,2) ВИРУСЫ БАКТЕРИЙ (БАКТЕРИОФАГИ). ИСТОРИЯ ИЗУЧЕНИЯ БАКТЕРИОФАГОВ

Цель работы: познакомиться с историей изучения бактериофагов.

Ход работы:

Теоретическая часть

Бактериофаги – вирусы бактерий. Их геном представлен либо ДНК, либо РНК. В вирионах большинства ДНК-содержащих фагов нуклеиновая кислота двуцепочечная, но в некоторых случаях ДНК бывает одноцепочечной. В вирионах всех известных РНК-содержащих фагов нуклеиновая кислота одноцепочечная. Геном фага заключен в белковую оболочку (капсид), структурные субъединицы которой уложены по типу либо спиральной (фаг fd), либо кубической симметрии. Крупные фаги, имеющие хвостик, устроены по типу бинарной симметрии (головка – икосаэдр, хвостик – спиральная симметрия). Фаги различаются по форме – нитевидные, сферические; фаги, имеющие головку и хвостик; по размерам – мелкие, среднего размера и крупные. Чем крупнее фаги, тем больше у них генов и сложнее их жизненный цикл. К самым маленьким относится нитевидный фаг M13, геном которого (однонитевая кольцевидная молекула ДНК с м.м. 2МД) содержит 8 генов.

Бактериофаги были открыты случайно, в 1910-х годах при клинических исследованиях, которые Фредерик Туорт и Феликс д'Эррель проводили на микрококках и дизентерийной палочке.

Сперва интерес исследователей, прежде всего участников «фаговой» группы в Колд-Спринг Харборе, привлекли бактериофаги T1–T7, размножающиеся в клетках *E. coli* штамм В и обозначенные как «четные» (T2, T4 и T6) и «нечетные» (T1, T3, T5 и T7). Они различаются по свойствам и объединены в Т-серию (сокр. от англ. **type**) только согласно хронологической последовательности их выделения.

Тем не менее при изучении инфекционного цикла Т-фагов были совершены крупнейшие открытия в области молекулярной генетики. В 1952 г. Альфред Херши и Марта Чейз доказали, что роль генетического материала выполняет ДНК; в 1956 г. Элиот Волькин (E. Volkin) и Лазарус Астрахан (L. Astrachan) открыли мРНК; в 1959 г. Сеймур Бензер (S. Benzer) впервые доказал, что гены имеют кодирующую структуру. Позднее, в 1984 г. Мэрлин Белфорт (M. Belfort) и ее сотрудники открыли у фага T4 интрон I группы (он удаляется путем автосплайсинга); это был первый случай, когда интроны были обнаружены у неэукариотов. Наконец, многокопийная плазида pTZ со встроенным промотором фага T7 стала широко применяться в качестве вектора при разнообразных молекулярно-генетических исследованиях. В свою очередь, модифицированная ДНК-полимераза фага T7 («Sequenase») стала ферментом, который часто используется при молекулярном секвенировании генов.

ДОКЛАДЫ ПО ТЕМАМ (ЗАСЛУШАТЬ):

1. Феликс д'Эррель и его вклад в изучение бактериофагов.
2. Ермольева З.В. и ее вклад в изучение бактериофагов.
3. Изучение и применение бактериофагов в СССР.

4. Бактериофаги и их применение в разных областях.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 8 (1) ВИРУСЫ БАКТЕРИЙ. ОСНОВНЫЕ ОСОБЕННОСТИ БАКТЕРИОФАГОВ. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ, КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ УЧЕТ И ПРЕПАРАТИВНОЕ ПОЛУЧЕНИЕ БАКТЕРИОФАГОВ

Цель работы: изучить особенности бактериофагов как вирусов, изучить методы культивирования, количественного учета и препаративного получения бактериофагов.

Ход работы:

Теоретическая часть

Бактериофаги – это вирусы, поражающие бактерии. Они играют важную роль в природе, поддерживая баланс экосистем, а в медицине их используют для борьбы с бактериальными инфекциями, в том числе с теми, к которым у бактерий развилась устойчивость к антибиотикам.

Бактериофагия – процесс взаимодействия фагов с бактериями, заканчивающийся очень часто их разрушением (от лат. bacteriophaga – пожирающий бактерии).

Некоторые особенности бактериофагов (фагов):

- **Строгий внутриклеточный паразит** – размножается только внутри бактериальной клетки, не культивируется на искусственных питательных средах.
- **Специфичность** – каждый бактериофаг способен лизировать только определённый вид бактерий.
- **Устойчивость к физическим и химическим факторам** – выдерживают колебания pH в пределах 5,0–8,0, резистентны к ряду дезинфектантов и жирорастворителей, хорошо сохраняются при низких температурах, но не выдерживают нагревания до 65–70 °С, а также инактивируются при действии ультрафиолетового облучения.

Бактериофаги обладают разнообразным, нередко сложным строением, что позволяет использовать их морфологию в качестве одного из критериев семейства или рода.

Бактериофаги разных морфологических типов и семейств значительно отличаются друг от друга по своему строению

- нитевидные (палочковидные) фаги;
- мелкие фаги без отростка;
- кубические фаги с аналогом (рудиментом) отростка;
- фаги с коротким отростком (хвостом);
- фаги с длинным отростком и несокращающимся чехлом;
- фаги с длинным отростком и сокращающимся чехлом.

Однако классические фаги, так называемой «хвостатой» формой, составляют основную массу бактериофагов (96%).

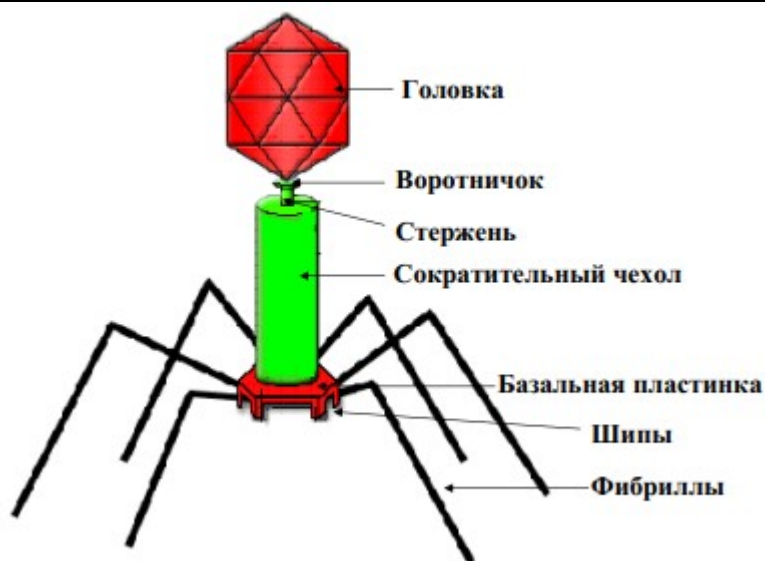
Типичная фаговая частица (вирион) состоит из головки и хвоста. Длина хвоста обычно в 2–4 раза больше диаметра головки. В головке содержится генетический материал – одноцепочечная или двуцепочечная РНК или ДНК с ферментом транскриптазой в неактивном состоянии, окружённая белковой или липопротеиновой оболочкой – капсидом, сохраняющим геном вне клетки.

Нуклеиновая кислота и капсид вместе составляют нуклеокапсид. Бактериофаги могут иметь икосаэдральный капсид, собранный из множества копий одного или двух специфичных белков. Обычно углы состоят из пентамеров белка, а опора каждой стороны из гексамеров того же или сходного белка. Более того, фаги по форме могут быть сферические, лимоновидные или плеоморфные.

Хвост, или отросток, представляет собой белковую трубку – продолжение белковой оболочки головки, в основании хвоста имеется АТФ-аза, которая регенерирует энергию для инъекции генетического материала. Отросток имеет вид полый трубки,

окружённой чехлом, содержащим сократительные белки. У ряда вирусов чехол способен сокращаться, обнажая часть стержня. На конце отростка у многих бактериофагов имеется базальная пластинка, от которой отходят тонкие длинные нити (фибриллы), способствующие прикреплению фага к бактерии.

Задание 1. Рассмотреть и зарисовать схему строения типичного бактериофага



Теоретическая часть

По спектру литического действия выделяют следующие группы бактериофагов:

- типовые (типоспецифические) бактериофаги (Т-фаги) взаимодействуют с отдельными типами (вариантами) бактерий внутри одного вида;
- моновалентные бактериофаги (монофаги) взаимодействуют с бактериями одного вида;
- поливалентные бактериофаги (полифаги) взаимодействуют с бактериями нескольких родственных видов.

Бактериофаги по способности вызывать инфекцию (механизму взаимодействия с бактериями) подразделяются на **вирулентные** и **умеренные**. **Вирулентные (литические)** бактериофаги проникают в бактерии, размножаются в них и выходят из бактериальной клетки, вызывая ее лизис. **Умеренные бактериофаги** после проникновения в клетку встраивают свою нуклеиновую кислоту в геном бактерии и не вызывают её лизиса.

Методы культивирования, количественного учета и препаративного получения бактериофагов.

Основные методические приемы при выявлении бактериофагов, определении их активности и подсчете фаговых частиц основаны на способности фагов вызывать лизис бактериальных клеток при выращивании в жидких или твердых питательных средах. Бактериофаг, добавленный к суспензии бактерий, после заражения и образования потомства приводит к просветлению бактериальной культуры, либо, в случае полного лизиса клеток, среда становится совершенно прозрачной. В некоторых случаях после отмеченного лизиса культуры может наблюдаться вторичный ее рост за счет размножения имеющихся в популяции фагорезистентных клеток. Размножение бактериофага и соответственно лизис клеток чувствительной культуры на поверхности агаризованной питательной среды проявляется в том, что в месте нанесения суспензии фага рост бактерий отсутствует. Лизис культуры за счет развития бактериофага на бактериальном газоне приводит к образованию округлых прозрачных участков, называемых **стерильными пятнами**, **фаговыми бляшками** или **негативными**

колониями фага, которые хорошо заметны при просмотре чашек в проходящем свете (РАССМОТРЕТЬ РИСУНОК).

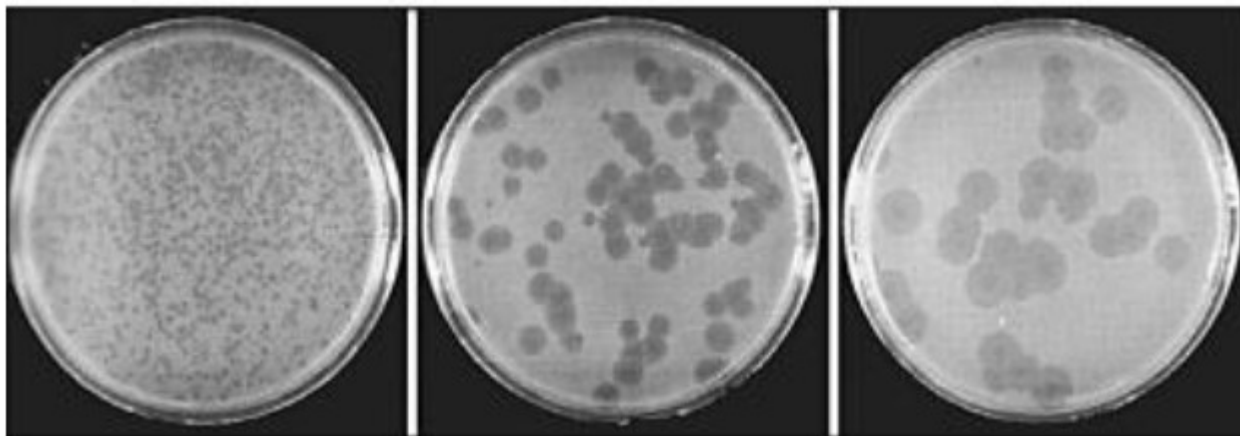


Рисунок. Негативные колонии бактериофагов

Размер и форма негативных колоний являются важной характеристикой фага, например, у дизентерийных бактериофагов негативные колонии имеют звездчатую форму. Однако морфология негативных колоний может варьировать в зависимости от условий культивирования (плотности и состава среды, температуры культивирования и др.), поэтому изучение и описание данного свойства проводят в строго стандартных условиях.

Негативные колонии бактериофагов по величине негативные колонии подразделяются на **крупные, средние, мелкие и точечные**. Диаметр образующихся колоний пропорционален скорости репродукции фага, скорости освобождения фаговых частиц из клеток и их адсорбции на поверхности неинфицированных бактериальных клеток и может быть пропорционален размеру фаговых частиц, который определяет скорость их диффузии в агаре. Крупные фаги образуют мелкие негативные колонии, фаги с небольшим размером частицы – крупные негативные колонии. Морфология негативной колонии относится к признакам, чрезвычайно специфичным для данного фага, иногда для группы родственных фагов. Фаговые бляшки могут быть прозрачными или выглядеть мутными. Мутные бляшки обычно образуют умеренные бактериофаги, поскольку большинство бактериальных клеток внутри бляшки остаются лизогенными. Стерильное пятно может быть окружено одной или несколькими зонами неполного лизиса, имеющими вид окружностей различной ширины. Иногда негативные колонии опалесцируют, что обусловлено рассеянием света большим количеством фаговых частиц в негативной колонии. Сформировавшаяся негативная колония содержит 10^6 – 10^9 фаговых частиц. Размножение бактериофага в популяции бактерий представляет собой совокупность множества отдельных идентичных друг другу инфекционных процессов в изолированных бактериальных клетках. Взаимодействие каждой частицы фага с бактериальной клеткой характеризуется определенной протяженностью внутриклеточного периода развития, так называемого латентного периода. **Латентный период** – это минимальный промежуток времени с момента адсорбции фага до лизиса клетки. Первая половина латентного периода, во время которой еще не удастся обнаружить в зараженной клетке инфекционный фаг, называется **скрытым периодом**.

Второй важной характеристикой взаимодействия фага с клеткой бактерии является **выход (урожай) фага** – среднее количество частиц бактериофага, освобождаемых клеткой в момент лизиса. Можно также рассчитать **средний выход фага** – отношение общего количества бляшкообразующих единиц (БОЕ) фага к числу первоначально зараженных бактерий.

Вышеперечисленные характеристики, присущие системе фаг – бактерия, можно определить в опыте по изучению **одиночного цикла развития бактериофага (ОЦР)**, предложенного Е. Эллисом и М. Дельбрюком в 1939 г. В опыте по изучению ОЦР

культуру чувствительных к данному фагу бактерий инфицируют частицами бактериофага в таком количестве, чтобы обеспечить заражение только 10 % клеток (множественность инфекции составит 0,1).

Множественность инфекции (MOI) в микробиологии – это соотношение инфекционных агентов (например, фагов, вирусов, бактерий) к мишеням инфекции (например, клеткам).

Например, если в культуру бактериальных клеток добавили 100 частиц фага, а в культуре содержится 10 000 бактериальных клеток, то MOI будет равен $100/10\,000 = 0,01$.

MOI – статистическая мера, она не учитывает вариабельность количества инфекционных агентов, которые попадут в каждую клетку. Некоторые клетки могут поглотить более одного агента, в то время как другие – ни одного.

Так как адсорбция частиц фага на клетках бактерий происходит в результате их случайных столкновений, то при указанном их соотношении большинство клеток будет адсорбировать только по одной фаговой частице. После непродолжительного периода (около 5 мин), в течение которого адсорбируется основное количество частиц бактериофага, весь неадсорбировавшийся фаг нейтрализуют антифаговой сывороткой. Для полного исключения адсорбции фага на бактериальных клетках дополнительно разводят инфицированную культуру для уменьшения концентрации фаговых частиц и клеток бактерий и сведения скорости адсорбции до минимума. После этого через определенные промежутки времени в течение 20–40 мин отбирают пробы и испытывают на наличие фага методом агаровых слоев. Подсчет числа негативных колоний на следующий день эксперимента показывает, что на чашках, засеянных инфекционной смесью, взятой на протяжении определенного периода времени после начала заражения суспензии бактерий фагом, число негативных колоний будет оставаться постоянным во всех пробах. Это время и будет представлять собой латентный период размножения бактериофага (РАССМОТРЕТЬ РИСУНОК).

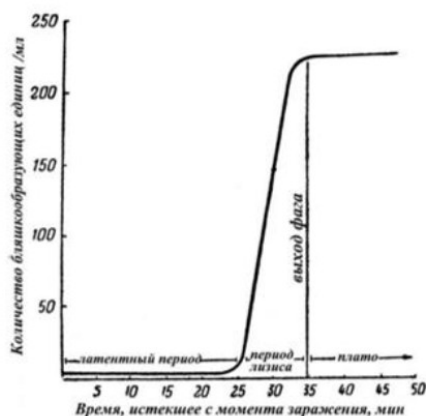


Рисунок – Опыт с одиночным циклом размножения фага.

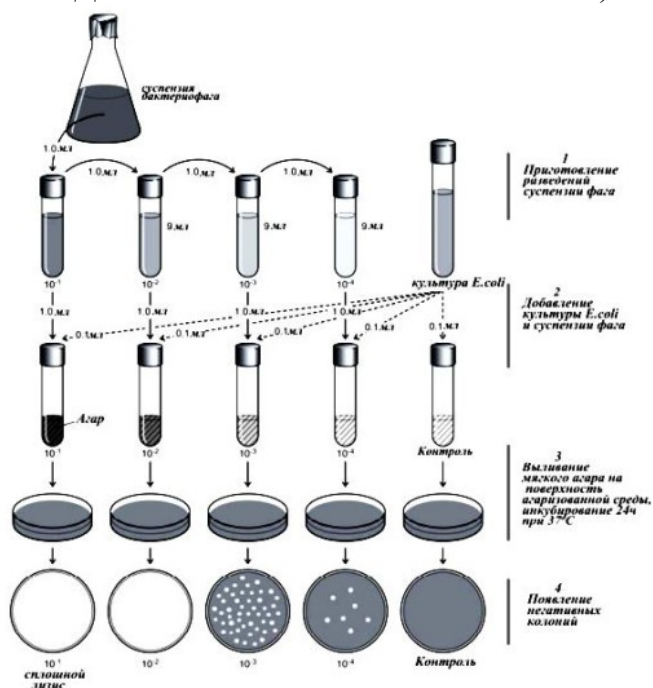
Стерильные пятна, образованные на чашках, засеянных в этот период явились результатом завершения одиночного цикла размножения бактериофага в зараженных клетках уже после посева пробы.

После завершения латентного периода наступает лизис клеток бактерий и в жидкую культуральную среду начинает выходить многочисленное фаговое потомство. Поэтому в пробах, взятых после завершения латентного периода и посеянных на чашки, обнаруживается внезапное увеличение количества стерильных пятен. Их количество возрастает в течение некоторого времени, иногда называемого **периодом выхода фага**, или периодом лизиса, до тех пор, пока все инфицированные клетки не лизируются. После этого на чашках опять обнаруживается постоянное количество негативных колоний, которое соответствует общему количеству фагов, освобожденных при лизисе всех зараженных клеток, и отражает установление нового (конечного) титра фага.

Задание 2. Изучить методы определения титра бактериофагов, определить титр бактериофага

Титр бактериофага – это количество активных фаговых частиц в единице объема исследуемого материала. Для определения титра бактериофага наиболее широко в практике работы с бактериофагами применяется метод агаровых слоев, предложенный А. Грациа (A. Gratia) в 1936 г. Этот метод отличается простотой выполнения и точностью получаемых результатов и с успехом используется также и для выделения бактериофагов. Сущность метода состоит в том, что суспензию бактериофага смешивают с культурой чувствительных бактерий, вносят в полужидкий («мягкий») агар (0,6–0,7 %) и наслаивают на поверхность ранее подготовленного 1,5 % питательного агара в чашке Петри. При инкубации в течение 6–18 ч бактерии размножаются внутри верхнего слоя агара в виде множества колоний, получая питание из нижнего слоя 1,5 % (плотного) питательного агара, который применяется в качестве подложки. Низкая концентрация агара в верхнем слое создает пониженную вязкость, что способствует хорошей диффузии фаговых частиц и инфицированию ими бактериальных клеток. Инфицированные бактерии подвергаются лизису, в результате чего появляется потомство фага, которое вновь заражает находящиеся в непосредственной близости с ними бактерии. Образование негативной колонии для фагов Т-группы вызвано только одной частицей бактериофага, и, следовательно, число негативных колоний служит количественным показателем содержания бляшкообразующих единиц в исследуемом образце.

Техника титрования и культивирования бактериофагов. (РАССМОТРЕТЬ И ЗАРИСОВАТЬ СХЕМУ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТИТРА БАКТЕРИОФАГА)



Для определения титра бактериофага производят последовательное разведение исходной фаговой суспензии в буферном растворе либо в бульоне (шаг разведения – 10⁻¹). Для каждого разведения используют отдельную пипетку, а смесь интенсивно перемешивают. Из суспензии каждого разведения по 1 мл разведенного фага вносят в пробирку с 3 мл расплавленного и охлажденного до 48–50 °С «мягкого» агара. Затем в каждую пробирку добавляют 0,1 мл культуры чувствительного микроорганизма (например, *E. coli*). Содержимое пробирки перемешивают, вращая пробирку между ладонями, избегая образования пузырей, и быстро выливают на поверхность плотной (1,5 %) питательной среды в чашке Петри и равномерно распределяют по ней, осторожно покачивая чашку. После застывания верхнего слоя чашки переворачивают крышками вниз

и помещают в термостат при температуре, оптимальной для развития чувствительных бактерий. Учет результатов производят через 18–20 ч инкубирования. Количество негативных колоний подсчитывают аналогично подсчету колоний бактерий, а титр фага определяют по формуле:

$$N = \frac{n \cdot D}{V},$$

где N – количество фаговых частиц в 1 мл исследуемого материала;

n – среднее количество негативных колоний на чашку;

D – номер разведения;

V – объем высеваемой пробы, мл.

Задание 3: Изучить техники получения фаголизата.

Бактериофаги обнаруживаются во внешней среде (почва, вода, пищевые продукты), в выделениях людей, животных в популяциях пораженных фагом бактерий.

Фаголизат – суспензия бактериофага, полученная после лизиса зараженных фагом клеток бактерий. Для получения фаголизатов можно использовать как жидкие, так и агаризованные питательные среды. Фаголизат получают путем размножения фага на клетках чувствительной культуры. В бульонную культуру бактерий *E. coli* вносят 1–2 мл фаговой суспензии либо касаются бактериальной петлей изолированной негативной колонии и эмульгируют ее в питательном бульоне.

После соответствующего периода инкубирования и просветления суспензии фаголизат освобождают от бактериальных клеток одним из следующих способов:

- 1) фильтрованием через мембранный фильтр;
- 2) центрифугированием для осаждения клеток (6 000 об/мин, 10 мин);
- 3) обработкой фаголизата хлороформом в соотношении 10:1 с последующим энергичным встряхиванием в течение минуты, инкубированием в течение часа при комнатной температуре и центрифугированием.

Техника получения фаголизата бактериофагов Т-группы в жидкой питательной среде

18–24-часовую культуру чувствительных к фагу бактерий (*E. coli*) засевают в жидкую питательную среду в соотношении 1:10 и культивируют с аэрированием при оптимальных условиях (37 °С) до логарифмической фазы роста в течение 2,5–3 ч (до плотности 2×10^8 кл/мл). После этого в бактериальную культуру добавляют суспензию фага с таким расчетом, чтобы множественность инфекции составляла 1, и продолжают инкубирование в течение 6–8 ч с аэрацией до просветления бактериальной культуры.

Фаголизат освобождают от бактерий низкоскоростным центрифугированием (6 000 об/мин, 10 мин) или фильтрованием через бактериальные фильтры.

Техника получения фаголизата бактериофагов Т-группы на плотной питательной среде

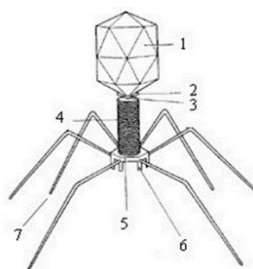
Этот метод заключается в лизисе фагом густой суспензии чувствительных бактерий в слое полужидкого агара. В 3 мл 0,7 % питательной среды вносят 0,1 мл культуры чувствительных бактерий *E. coli* и 1 мл суспензии одного из фагов Т-группы (конечная концентрация 10^4 – 10^5 частиц/мл), перемешивают и выливают на поверхность 1,5 % плотной питательной среды в чашках Петри. Таким образом проводят засев нескольких чашек. Чашки инкубируют в течение 18–20 ч, а затем в каждую из них вносят 5 мл физиологического раствора или жидкой питательной среды и шпателем осторожно снимают верхний (0,7 %) слой агара. Для удаления бактерий и остатков агара полученную массу центрифугируют (6 000 об/мин, 10 мин).

Экспериментально выявлено, что на плотной питательной среде количество полученного фаголизата оказывается меньше, чем в случае приготовления его в жидкой питательной среде, но титр бактериофага в этом случае несколько выше – 10^9 – 10^{10} частиц/мл.

Спектр применения бактериофагов достаточно широкий. В частности, фаги используют для идентификации микроорганизмов, в том числе и для диагностики инфекционных заболеваний. Фагодиагностику бактерий осуществляют путем постановки пробы на фаголизис в жидкой или плотной питательной среде. Методы фагодиагностики используют главным образом при работе с возбудителями кишечных и особо опасных инфекций (дизентерии, брюшного тифа, сальмонеллез, чумы, холеры, сибирской язвы, бруцеллеза и др.). Высокая чувствительность бактерий к специфическому фагу позволяет отличить близкородственные виды, (возбудителя чумы от возбудителя псевдотуберкулеза, холерный вибрион от холероподобного). С помощью бактериофагов можно определить типы (варианты) внутри одного вида бактерий.

Задание 4. Определите структурные элементы бактериофага

- | | |
|----------|----------|
| 1. _____ | 5. _____ |
| 2. _____ | 6. _____ |
| 3. _____ | 7. _____ |
| 4. _____ | |



Контрольные вопросы:

1. Дайте определения понятиям «бактериофаг» и «бактериофагия».
2. Распределение фагов на группы по спектру литического действия.
3. Распределение бактериофагов по способности вызывать инфекцию.
4. Распределение фагов на морфологические типы.
5. На чем основаны основные приемы выявления бактериофагов, определения их активности и подсчета фаговых частиц?
6. Дайте определения понятиям «выход (урожай) фага», «средний выход фага», «период выхода фага».

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 8 (2) ВИРУЛЕНТНЫЕ И УМЕРЕННЫЕ ФАГИ. ЖИЗНЕННЫЙ ЦИКЛ БАКТЕРИОФАГОВ (ПРОЦЕСС ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С БАКТЕРИАЛЬНОЙ КЛЕТКОЙ). ПОНЯТИЕ О ТРАНСДУКЦИИ.

Цель работы: изучить жизненные циклы вирулентных и умеренных фагов. Познакомиться с понятием трансдукция и ее этапами.

Ход работы:

Теоретическая часть

Вирулентные и умеренные фаги различают по характеру взаимодействия бактериофага с бактериальной клеткой. Вирулентные фаги способны вызвать продуктивную форму инфекции, а умеренные фаги способны вызывать не только продуктивную, но и редуцирующую фаговую инфекцию.

Жизненный цикл вирулентного фага складывается из следующих стадий.

Адсорбция фагов на клеточной поверхности бактерий при помощи специфических рецепторов (белков-лоцманов), которые располагаются на кончике нити, шипа или хвостика и распознают на клеточной стенке бактерии ее фагоспецифические рецепторы. Адсорбция фага – пусковой момент его жизненного цикла. Она очень специфична и поэтому обуславливает возможность практического использования фагов, например, для идентификации бактерий, а также для лечебных и профилактических целей.

Проникновение фагового генома через клеточную стенку и цитоплазматическую мембрану внутрь клетки и освобождение его от оболочки (раздевание фага). Сразу после того, как фаговая ДНК попадает в цитоплазму клетки, РНК-полимераза клетки начинает транскрибировать некоторые ее гены и образуются ранние вирусные информационные РНК. Затем рибосомы клетки-хозяина транслируют эти вирусные мРНК, образуя целый ряд новых ферментов, включая и ферменты, необходимые для репликации фаговой ДНК. Многие вирусы, в отличие от Т-четных фагов, обеспечиваются некоторыми важными ферментами за счет генома клетки хозяина. В случае РНК-содержащих бактериофагов молекула РНК проникает в цитоплазму клетки, распознается рибосомами как информационная. Рибосомы связываются с ней и синтезируют вирусные белки (в том числе РНК-зависимую РНК-полимеразу, которая осуществляет репликацию вирусной РНК.).

Репликация фаговой геномной ДНК или РНК, которая протекает в соответствии с общим механизмом репликации. Установление фагового генома с помощью белка-лоцмана для реализации содержащейся в геноме информации:

1. однострунчатая ДНК – к репликативному аппарату для синтеза комплементарной ей нити и образования репликативной формы; далее ее поведение аналогично двуструнчатой ДНК;
2. двуструнчатая ДНК – к транскрипционному аппарату для синтеза мРНК и последующей трансляции вирусспецифических белков (ферментов и структурных);
3. РНК-геном – к трансляционному аппарату для синтеза вирусспецифических белков (ферментов репликации и структурных).

После начала репликации начинается синтез поздних вирусных информационных РНК. В результате трансляции поздних мРНК образуется второй набор вирусспецифических белков, в том числе субъединицы вирусного капсида.

Сборка структурных компонентов фаговых частиц. Вновь синтезированные белки в цитоплазме клетки формируют капсиды, отростки и другие структуры дочерних фаговых частиц. После этого синтезированная нуклеиновая кислота фагов заполняет пустотелые капсиды головок.

Сборка вновь синтезированных вирионов – заключение геномной нуклеиновой кислоты в белковую оболочку, морфогенез фагов. Особенности морфогенеза фагов. Морфогенез мелких фагов протекает по типу самосборки. У крупных фагов этот процесс носит более сложный характер. Например, морфогенез фага Т4 требует активности более чем 40 генов и протекает при участии трех самостоятельных линий. На одной из них происходит сборка хвостика (участвует около 20 генов), на другой - головки фага (не менее 16 генов) и на третьей - сборка ворсинок (5 генов). Соединение хвостика с головкой не требует участия генов, однако оно не может произойти до тех пор, пока и хвостик, и головка не будут смонтированы полностью. Заполненный нуклеиновой кислотой капсид взаимодействует с хвостовой частью и образует зрелую фаговую частицу. Соединение хвоста с головкой происходит только после полной их сборки. Точно так же ворсинки присоединяются к хвосту только после полного соединения отростка с головкой. Благодаря строгому генетическому контролю со стороны фага обеспечивается последовательность и согласованность всех процессов его внутриклеточного размножения. После сборки в каждой бактериальной клетке накапливается до 200 фаговых частиц.

Выход вновь синтезированных фагов из клетки происходит путем лизиса клетки изнутри. Он осуществляется лизоцимом и вызывает гибель клетки. Лизоцим синтезируется как поздний вирус-специфический белок. Он воздействует на пептидогликановый слой стенки бактериальной клетки, в результате стенка разрывается, фаговое потомство выходит из клетки. Иногда происходит лизис бактерий извне как следствие адсорбции многих фагов на одной клетке, но при этом размножения фагов не происходит. Обычно же после внедрения фагового генома в клетку у нее возникает

состояние иммунитета к суперинфекции данным фагом, т. е. проникновение других фаговых геномов становится невозможным.

Умеренные фаги способны вызывать не только продуктивную, но и редуکتивную фаговую инфекцию. При **редуктивной инфекции** – геном фага проникает в клетку, но размножения фага не происходит, т. к. его геном интегрируется в хромосому клетки-хозяина (становится ее составной частью), т. е. фаг превращается в **профаг**. Клетка, несущая профаг, называется **лизогенной**, т. к. профаг, передающийся клеткой по наследству, может выйти из хромосомы, активироваться и вызвать продуктивную форму инфекции. Если в результате лизогении, т. е. внедрения профага в хромосому клетки-хозяина, она получает новые наследуемые признаки, такую форму ее изменчивости называют **лизогенной или фаговой конверсией**, т.е. изменчивостью, обусловленной лизогенией.

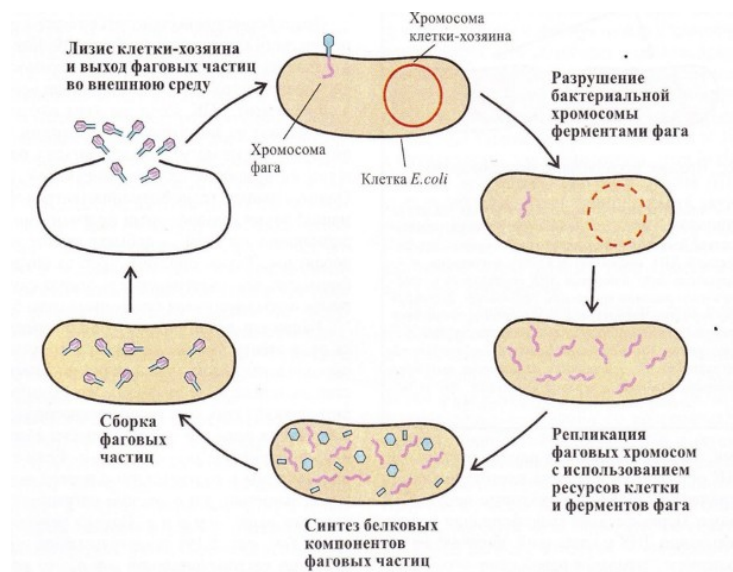
Жизненный цикл фага (при редуکتивной инфекции) складывается из следующих стадий:

- а) адсорбция фага на поверхности клетки;
- б) проникновение фаговой ДНК в бактериальную клетку;
- в) сайт-специфическая интеграция фаговой ДНК в хромосому клетки-хозяина и превращение фага в профаг.

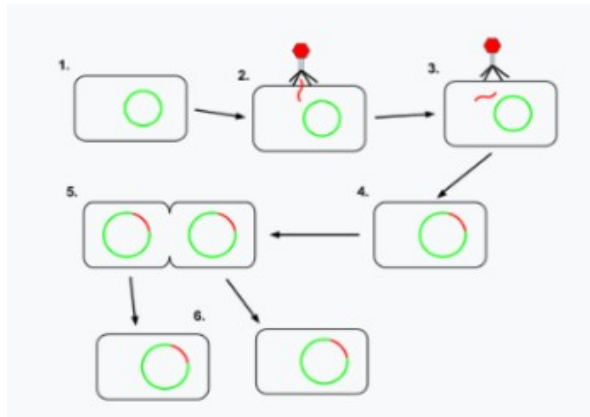
Лизогенную конверсию вызывают только умеренные фаги. Различают монолизогенность и полилизогенность. Бактериальная культура, образующая после индукции один вид фага, называется монолизогенной, а бактериальная культура, образующая несколько видов фагов, называется полилизогенной. ДНК умеренного фага встраивается в строго определенную область генома, синхронно с ним реплицируется и передается по наследству. При лизогении фагового потомства не образуется, т. к. в бактерии синтезируется специфический низкомолекулярный белок репрессор, подавляющий транскрипцию фаговых генов. Биосинтез репрессора детерминируется генами профага. Лизогенные бактерии приобретают иммунитет (невосприимчивость) к последующему проникновению и размножению в них родственного фага.

У некоторых лизогенных культур спонтанно или под действием физических факторов и химических веществ (УФ-лучи, ионизирующее излучение, перекисные соединения, митомицин С и др.) профаг может исключаться из хромосомы и становится литическим фагом. Этот процесс называется индукцией профага. Он заканчивается продукцией фагов и лизисом бактерий.

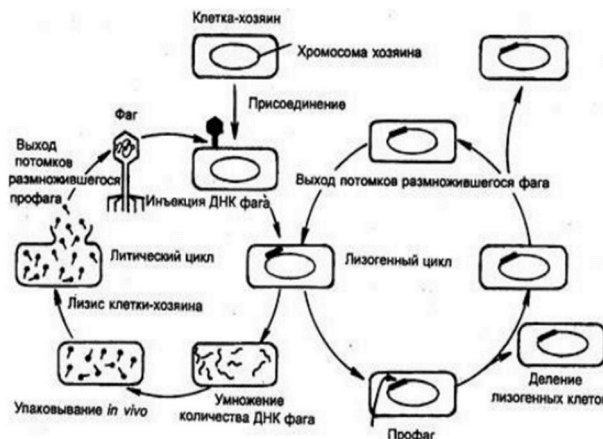
Задание 1. Рассмотреть схему жизненного цикла вирулентных фагов



Задание 2. Рассмотреть схему жизненного цикла умеренных фагов (лизогенный цикл)



Задание 3. Рассмотреть и зарисовать схематическое изображение литического и лизогенного циклов умеренных фагов



Теоретическая часть

Умеренные фаги, встраиваясь в геном микробной клетки, способны захватывать некоторые бактериальные гены и передавать их новому хозяину. Передача генов от одной бактерии (от бактерии – донора) другой бактерии (бактерии – реципиенту) с помощью умеренного фага называется **трансдукцией**. Различают три типа трансдукции: неспецифическую (общую, генерализованную), специфическую (локализованную) и абортивную.

Механизм **неспецифической трансдукции** заключается в том, что в процессе внутриклеточного размножения фага в его геном случайно включается какой-либо фрагмент бактериальной ДНК. В результате этого возникают фаговые частицы, у которых наряду с собственной фаговой ДНК содержится фрагмент ДНК бактерии. Эти фаги сохраняют инфекционную способность и при адсорбции на бактериальной клетке вводят в нее ДНК клетки донора. В случае встраивания привнесенного фрагмента ДНК в гомологичную область генома клетки-реципиента этот признак будет наследственно закрепляться.

Введенная ДНК клетки-донора наделяет клетку-реципиент (**трансдуктант**) новыми признаками.

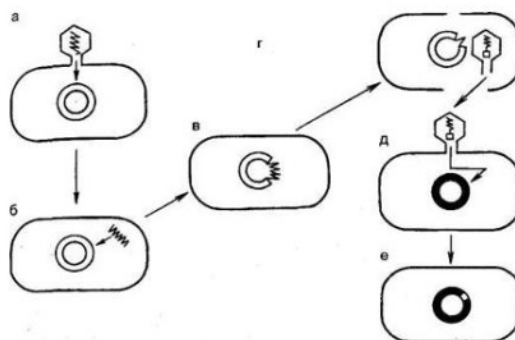
Феномен трансдукции впервые обнаружили в 1952 г. американские вирусологи Дж. Ледерберг и Н. Зиндер на примере фага P22. При одновременном высеве на минимальную среду двух штаммов *Salmonella enterica* серовар *Typhimurium*, ауксотрофных по разным наборам аминокислот, выросло небольшое количество колоний дикого типа, что свидетельствовало о рекомбинационном переносе генов. Ответственный за это вирулентный фаг P22 и сейчас остается одним из модельных объектов молекулярной генетики бактерий и их вирусов.

При **специфической трансдукции** фаги переносят только определенные гены клетки-донора. Это связано с тем, что при специфической трансдукции образование трансдуцирующего фага происходит в результате соединения его ДНК со строго

определенными генами донора. При освобождении такой фаг захватывает только рядом расположенную строго определенную область хромосомы донора и передает ее реципиенту. Некоторые из них делают это только в одном хромосомном сайте (фаг лямбда), поэтому размер и нуклеотидные последовательности переносимых фрагментов бактериальной ДНК строго определены. Другие бактериофаги могут интегрироваться в нескольких сайтах (свыше десяти в случае фага P2). Существуют бактериофаги, способные интегрироваться практически в любом участке хромосомы; пример – фаг мю (μ ; Mu). После эксцизии он захватывает с собой и передает реципиенту только те гены, которые находились по соседству с сайтом интеграции. При этом происходит не только лизогенизация, но и появление у реципиента нового признака (лизогенная конверсия). Например, умеренный фаг способен вызывать лизогенную конверсию дифтерийной палочки, превращая нетоксигенную культуру в токсигенную.

В некоторых случаях переносимый фрагмент ДНК не встраивается в геном реципиента, а сохраняется автономно в цитоплазме клетки. Это явление называется **абортной трансдукцией**. При делении бактерий фаговая ДНК передается только одной из двух дочерних клеток. При трансдукции возможен перенос генов, которые детерминируют питательные потребности бактерий, устойчивость клеток к лекарственным препаратам, ферментативную активность, подвижность, факторы патогенности и другие свойства.

Задание 4. Рассмотреть и зарисовать схему общей трансдукции



а – введение ДНК умеренного фага в донорскую клетку;

б, в – интеграция генома фага с геномом бактерий;

г – отщепление профага с захватом клеточного гена;

д, е – введение гена донора в реципиентную клетку с образованием трансдуктанта

Контрольные вопросы:

1. Какие формы фаговой инфекции Вам известны?
2. Охарактеризуйте жизненный цикл вирулентного бактериофага.
3. В чем отличия редуцтивной фаговой инфекции от продуктивной?
4. Перечислите этапы жизненного цикла умеренного бактериофага.
5. Дайте определения понятиям «фаг», «лизогения», «лизогенная культура».
6. Дайте определение понятию «трансдукция».
7. Кем и когда была открыта трансдукция?
8. Какие типы трансдукции известны?
9. Охарактеризуйте общую трансдукцию и бактериофагов, которые ее вызывают?
10. Назовите особенности специфической трансдукции и бактериофагов, которые ее вызывают?

ЛАБОРАТОРНЫЕ РАБОТЫ № 9 (1)

ВИРУСЫ БАКТЕРИЙ. БИОРАЗНООБРАЗИЕ БАКТЕРИОФАГОВ

Цель работы: изучить биоразнообразие бактериофагов.

Ход работы:

Теоретическая часть

У всех групп бактерий имеются собственные вирусы, среди которых наиболее изучены фаги бактерий кишечной группы (*E. coli* и *S. typhi* серовар *Typhimurium*).

Как вы уже знаете, существуют ДНК-содержащие и РНК-содержащие бактериофаги.

Бактериофаги с геномной dsДНК – самые разнообразные и многочисленные; они заражают представителей большинства бактерий. Именно они в свое время стали модельными объектами при изучении молекулярных основ наследственности; это для них были оптимизированы и стандартизированы методы поддержания и культивирования бактериофагов. Бактериофаги различаются и по морфологии. Так называемы «хвостатые» фаги объединены в большой класс *Caudoviricetes*.

Представители класса *Caudoviricetes*:

Фаг Т4. Его сложный вирион состоит из несколько вытянутой икосаэдрической головки (85×110 нм) и хвостового отростка (110×25 нм), который присоединяется к ней через шейку, содержащую воротничок с воротничковыми фибриллами. На дистальном конце хвостового отростка находится базальная пластинка с терминальными фибриллами. В геноме фага Т4 (166 тыс. п.н.) около 200 генов.

Фаг Т7. Бактериофаг, который вызывает преимущественно литическую инфекцию и образует сложно устроенные вирионы. Размер генома составляет 19–44 тыс. п.н. К икосаэдрической головке, диаметр которой 40–60 нм (высота несколько больше ширины), через переходник присоединяется короткий несократимый хвостовой отросток (≤10 нм). Цикл развития вирулентного фага Т7 подробно изучен. При инфицировании типовых штаммов *E. coli* в стандартных условиях лизис культуры начинается через 12–15 мин (при 37°C) или через 20–25 мин (при 30°C). Из одной клетки выходит в среднем 200 частиц. Геном фага Т7 (39937 п.н.) содержит 56 генов, в том числе гены субъединиц полимеразы.

Фаг лямбда. Его вирион состоит из головки диаметром 64 нм и несократимого хвостового отростка длиной 150 нм с внутренним стержнем; от конца отростка отходят хвостовые фибриллы длиной 23 нм. Геном фага лямбда (48514 п.н.) полностью секвенирован. В нем идентифицировано 46 генов и картированы регуляторные участки.

Представитель семейства *Tectiviridae*.

Фаг PRD1. У представителей данного семейства сферический вирион имеет икосаэдрическую симметрию, его диаметр составляет 63 нм. Внешний белковый капсид (очень похожий на капсид аденовирусов) имеет толщину 3 нм; на вершинах икосаэдра расположены пепломеры длиной 20 нм, обеспечивающие адсорбцию на клеточных рецепторах. Одна из вершин икосаэдра отличается от остальных по морфологии и составу; в этом месте формируется портал для упаковки ДНК.

Внутренний липопротеиновый капсид толщиной 5–6 нм представляет собой двухслойную мембрану, содержащую 56% фосфатидилэтаноламина и 37% фосфатидилглицерола. Представители данного семейства не имеют хвостового отростка; при адсорбции и проникновении сферическая мембрана их внутреннего капсида преобразуется в тубулярную структуру.

Геном тективиров (14,7–15,7 тыс. п.н.) представлен линейной суперспирализованной dsДНК, с обоими 5'-концами которой связаны молекулы терминального белка. Характерной для ДНК-содержащих бактериофагов мозаичности геномов у представителей данного семейства не наблюдается.

Хозяевами тективиров служат грамотрицательные протеобактерии и грамположительные представители рода *Bacillus*.

Бактериофаги с геномной ssДНК вызывают литическую, хроническую и/или лизогенную инфекцию. При разнообразии структуры вирионов они имеют сходную организацию генома, и их онтогенез протекает по общему сценарию.

Геномы этих бактериофагов невелики и содержат мало генов, которые, как правило, перекрываются. При размножении вируса используется хозяйский аппарат

транскрипции и репликации. Репликативными интермедиатами служат кольцевая dsДНК и линейные конкатемеры ssДНК(+).

Отдельные представители двух семейств этих бактериофагов являются модельными объектами молекулярной биологии и используются для конструирования генетических векторов.

Представитель семейства *Inoviridae*.

Фаг M13. Вирионы представителей этого семейства имеют относительно простую морфологию. Это длинные и гибкие нити без внешней оболочки ($600\text{--}2500 \times 6\text{--}10$ нм) с суперспирализованными кольцевыми ssДНК геномами размером около 5,5–10,6 тыс. пар оснований, кодирующими 7–15 белков. Носителями фагов семейства *Inoviridae* являются грамотрицательные бактерии.

Нитевидные фаги, в частности фаг M13 кишечной палочки, широко используются в качестве векторов клонирования (фагмид) при секвенировании ДНК, в технологии фагового дисплея и в других областях биотехнологии и нанотехнологии.

Представитель семейства *Microviridae*.

Фаг фX174. Бактериофаг инфицирующий *E. coli*. Его геном стал первым полностью секвенированным геномом; он также стал объектом, у которого был впервые описан феномен взаимного перекрывания генов. Изометрические частицы фага фX174 имеют диаметр 27 нм. Вирион состоит из 60 копий белков F, G и J, а также 12 копий белка Н. Белки G и Н образуют 12 выростов на вершинах икосаэдра; при адсорбции белок G прикрепляется к липополисахариду наружной мембраны.

Следует отметить, что фаг фX174 размножается не только на разных штаммах *E. coli*, но и на разных штаммах *P. aeruginosa*, относящихся к другому классу протеобактерий.

Бактериофаги с геномной dsРНК.

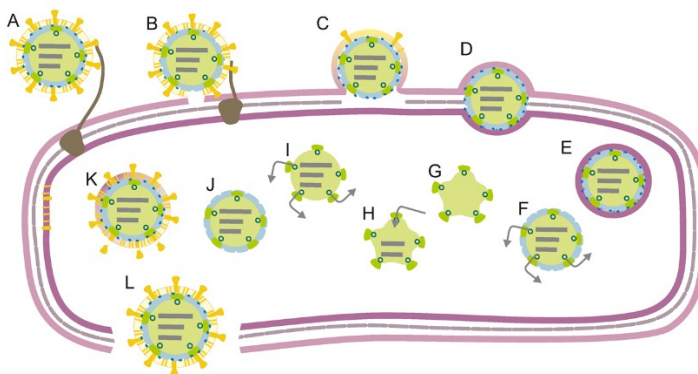
Бактериофаги с геномной РНК впервые описаны в начале 60-х годов XX в. Изучение их свойств во многом способствовало пониманию биологической роли РНК, а также расшифровке механизмов взаимодействия РНК с клеточными белками.

Представитель семейства *Cystoviridae*.

Фаг ф 6. Строение вирусов семейства *Cystoviridae* довольно однообразно. Сферические вирионы имеют диаметр 75–86 нм. Оболочка содержит фосфолипиды, позаимствованные у цитоплазматической мембраны, а также структурные вирусные белки Р9, Р10 и Р13. На поверхности суперкапсида равномерно распределены пепломеры, состоящие из белка Р3, который участвует в адсорбции, и белка Р6, обеспечивающего слияние оболочки с клеточной мембраной. Капсид изометрический, двухслойный. Внешний слой имеет толщину 58 нм, внутренний – 43 нм. Структурные белки вириона обладают ферментативной активностью: белки Р1, Р2, Р4 и Р7 входят в комплекс РНК-зависимой РНКполимеразы (RdRP); белки Р10 и Р5 выполняют роль эндопептидаз.

Хозяевами этих бактериофагов служат грамотрицательные бактерии рода *Pseudomonas*, в том числе фитопатогенные.

Задание 1. Рассмотрите и зарисуйте схематическое изображение жизненного цикла фага ф 6.



Семейство *Cystoviridae*. Схематическое изображение жизненного цикла фага ф 6, поражающего бактерии *Pseudomonas*. (А) Адсорбция. (В) Слияние оболочек. (С) Расщепление пептидогликана. (D–E) Эндоцитоз нуклеокапсида. (F) Ранняя транскрипция. (G) Сборка комплекса полимераз. (H) Упаковка и репликация одноцепочечной РНК. (I) Поздняя транскрипция. (J) Сборка нуклеокапсидной оболочки. (K) Транслокация вирусной оболочки и сборка шипов. (L) Лизис клетки-хозяина и высвобождение зрелых вирионов.

ЛАБОРАТОРНЫЕ РАБОТЫ № 9 (2) ВИРУСЫ БАКТЕРИЙ. БИОРАЗНООБРАЗИЕ БАКТЕРИОФАГОВ

Цель работы: изучить биоразнообразие бактериофагов

Ход работы:

Теоретическая часть

Бактериофаги с геномной ssРНК.

При попадании в клетку-хозяина смысловая геномная РНК используется в качестве мРНК. Последовательное осуществление трансляции и репликации регулируется элементами ее вторичной и третичной структуры. Хозяевами этих бактериофагов служат энтеробактерии (*Escherichia* spp, *Salmonella* spp и др.), а также бактерии родов *Acinetobacter*, *Caulobacter* и *Pseudomonas*.

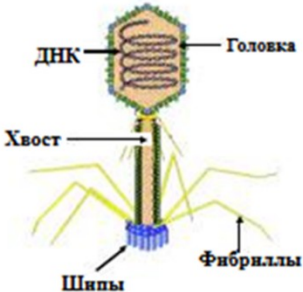
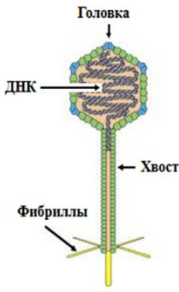
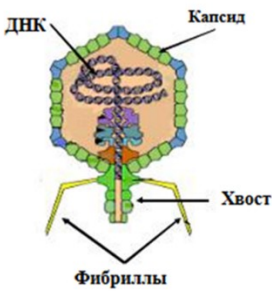
Представитель семейства *Fiersviridae*.

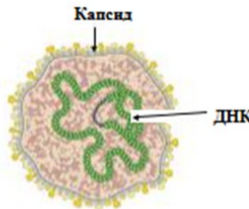
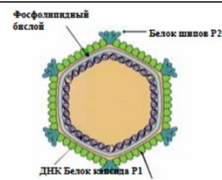
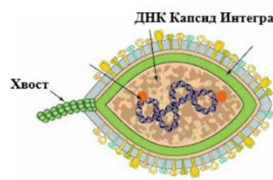
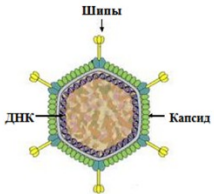
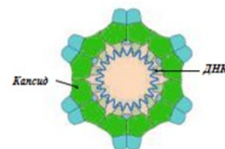
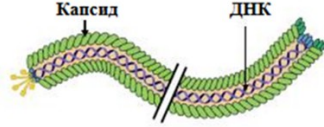
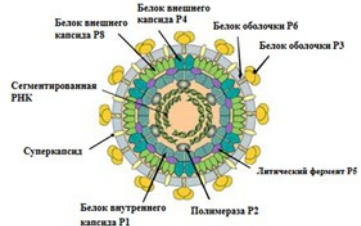
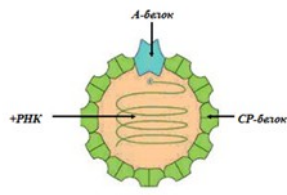
Фаг MS2. Геномы представителей семейства относительно невелики (3,5– 4,2 тыс. н.) и имеют единообразный набор генов. Взаимное родство подтверждается их общими фенотипическими признаками. В частности, они адсорбируются на конъюгативных фимбриях, их капсомеры имеют сходную структуру, а сборка их вирионов происходит посредством коагрегации геномной нуклеиновой кислоты и структурных белков.

Безоболоччные вирионы имеют небольшой размер (23–34 нм); помимо структурного белка в них входит одна копия белка созревания, обладающего ферментативной активностью.

Фаг MS2, стал одним из объектов, на которых впервые отрабатывались методы молекулярного секвенирования: еще в 1972 г. была частично реконструирована нуклеотидная последовательность его генома. Несмотря на малый размер (3569 н.), за счет взаимного перекрытия в нем содержатся гены четырех белков — репликазы, белка созревания А, белка-лизина и капсомера. Икосаэдрический вирион фага MS2 имеет размер 23–25 нм и состоит из 180 капсомеров.

Задание 1. Рассмотрите схемы строения бактериофагов различных таксономических групп

dsДНК-содержащие бактериофаги		
Класс <i>Caudoviricetes</i>		
		
Семейство <i>Lipothrixviridae</i>	Семейство <i>Plasmaviridae</i>	Семейство <i>Corticoviridae</i>

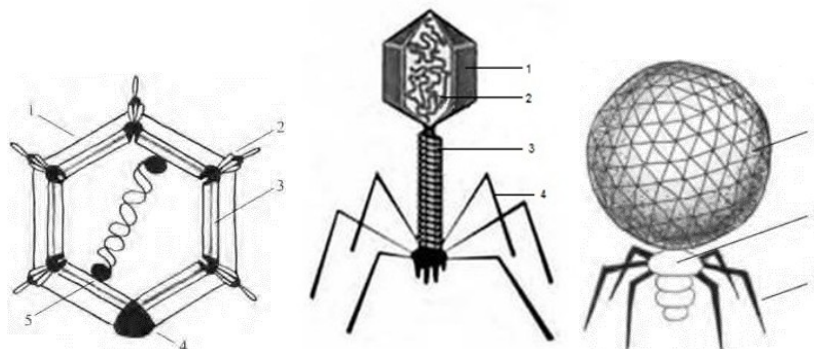
		
Семейство <i>Fuselloviridae</i>		Семейство <i>Tectiviridae</i>
		
ssДНК-содержащие бактериофаги		
Семейство <i>Microviridae</i>	Семейство <i>Inoviridae</i>	
		
dsРНК-содержащие бактериофаги		ssРНК-содержащие бактериофаги
Семейство <i>Cystoviridae</i>		Семейство <i>Fiersviridae</i>
		

Задание 2. Заполните таблицу «Биоразнообразие бактериофагов»

ДНК-содержащие бактериофаги		
Таксономические ранги	Особенности строения	Типичные представители
Класс <i>Caudoviricetes</i>		
Семейство <i>Lipothrixviridae</i>		
Семейство <i>Plasmaviridae</i>		
Семейство <i>Corticoviridae</i>		
Семейство <i>Fuselloviridae</i>		
Семейство <i>Tectiviridae</i>		
Семейство <i>Microviridae</i>		
Семейство <i>Inoviridae</i>		

РНК-содержащие бактериофаги		
Семейство <i>Cystoviridae</i>		
Семейство <i>Fiersviridae</i>		

Задание 3. Зарисуйте и отметьте структурные элементы вириона фага PRD1 (а), вириона фага лямбда (б), вириона фага Т7 (в).



- А)
 1. _____
 2. _____
 3. _____
 4. _____
 5. _____
- Б)
 1. _____
 2. _____
 3. _____
 4. _____
- В)
 1. _____
 2. _____
 3. _____

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №10 (1, 2).

ВИРУСЫ АРХЕЙ. ВИРУСЫ АРХЕЙ ТИПА *EURYARCHAEOTA*: ВИРУСЫ ЭКСТРЕМАЛЬНОГАЛОФИЛЬНЫХ АРХЕЙ, ВИРУСЫ МЕТАНОГЕННЫХ И ГИПЕРТЕРМОФИЛЬНЫХ АРХЕЙ. ВИРУСЫ АРХЕЙ ТИПА *CRENARCHAEOTA*.

Цель работы: изучение вирусов архей типа *Euryarchaeota*: вирусов экстремально галофильных архей, приспособленных к жизни в высоких концентрациях солей, и вирусов метаногенных архей. Изучение вирусов архей типа *Crenarchaeota*.

Ход работы:

Теоретическая часть

Археи (в единственном числе – архея, от лат. *Archaea*, «извечный, древний, первозданный, старый») – одноклеточные микроорганизмы, не имеющие ядра, а также каких-либо мембранных органелл. Ранее археи объединяли с бактериями в общую группу, именовали их археобактериями, однако сейчас такая классификация считается устаревшей, так как установлено, что археи имеют свою независимую эволюционную историю и характеризуются многими биохимическими особенностями, отличающими их от других форм жизни.

Археи подразделяют на более чем семь типов. Из них наиболее изучены кренархеоты (*Crenarchaeota*) и эвриархеоты (*Euryarchaeota*).

К типу *Euryarchaeota* относят метанообразующие археи (например, *Methanobacterium palustre*), экстремальные галофилы (например, *Halobacterium salinarum*) и некоторые экстремальные термофилы (например, *Thermoplasma acidophilum*).

Вирусы архей. Вирус, который заражает архей и размножается в них, а также в домене одноклеточных прокариотических организмов. Изначально вирусы архей называли «бактериофагами» или просто «фагами» – так же, как и бактериальные вирусы. Это отражало классификацию архей, в которой они относились к бактериям в системе, отделявшей прокариот от эукариот. В 1990 году археи были выделены в отдельный домен в рамках системы классификации, которая отделяла архей, бактерий и эукариот друг от друга. Через несколько лет термин «археобактериальный вирус» начали заменять на «археальный вирус». С 1990 года «архейный вирус» является доминирующим термином при описании вирусов, поражающих архей.

Архейные вирусы, как и их хозяева, встречаются по всему миру, в том числе в экстремальных условиях, непригодных для большинства живых организмов, например, в кислых горячих источниках, в водоемах с высоким содержанием соли и на дне океана. Все известные на данный момент вирусы архей имеют геномы, представленные ДНК: одноцепочечной или двухцепочечной, кольцевой или линейной. Недавно, однако, в горячих источниках Йеллоустонского национального парка, которые населены почти исключительно видом архей *Sulfolobus solfataricus*, с помощью метагеномики обнаружили вирусный РНК-геном, отдаленно напоминающий эукариотические РНК-содержащие вирусы, поэтому, возможно, существуют и РНК-содержащие вирусы архей.

Разнообразие архейных вирусов во многом обусловлено их морфологией. Их цельные тела, называемые вирионами, имеют самые разные формы: они могут быть похожи на веретена или лимоны, стержни, бутылки, капли или спирали. Некоторые из них содержат вирусную оболочку – липидную мембрану, окружающую вирусный капсид, в котором хранится вирусный геном. В некоторых случаях оболочка окружает геном внутри капсида. Все известные археовирусные геномы состоят из дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК). Почти все идентифицированные археовирусные геномы содержат двухцепочечную ДНК, и лишь у небольшого числа вирусов геном состоит из одноцепочечной ДНК. Большая часть генов, кодируемых археовирусными геномами, не имеет известных функций и не гомологична другим генам.

По сравнению с бактериальными и эукариотическими вирусами, вирусы архей изучены гораздо хуже. Несмотря на это, они очень разнообразны и относятся более чем к 20 семействам, многие из которых не имеют ничего общего с другими известными вирусами. В целом все вирусы архей можно разделить на две большие группы: те, которые имеют сходство с бактериальными и эукариотическими вирусами, и те, которые не имеют. К первой группе относятся вирусы, обнаруженные в реалмах *Duplodnaviria*, *Singelaviria* и *Varidnaviria*, которые, вероятно, имеют древнее происхождение. Ко второй группе относятся реалм *Adnaviria* и все семейства вирусов архей, не отнесенных к более высоким таксонам. Считается, что они появились сравнительно недавно из невирусных мобильных генетических элементов, таких как плазмиды.

Практически все специфические для архей вирусы поражают представителей типа *Crenarchaeota*, а вирусы, близкие к бактериофагам и вирусам эукариот, чаще всего паразитируют на археях типа *Euryarchaeota*.

Вирусы архей типа *Euryarchaeota*.

Вирусы эвриархеотов содержат линейную dsДНК; размер генома у них составляет 15–23 тыс. п.н. Их вирионы (за исключением сферических вирионов у галофагов His2 и SH1, а также эллипсоидного вириона у вируса VLP, хозяином которого служит *Methanococcus voltae*), похожи на Т-фагов или лямбдаподобных фагов – они состоят из

икосаэдрической головки и длинного или короткого хвостового отростка. Согласно современной классификации вирусов они принадлежат к классу *Caudoviricetes*.

Вирусы экстремально галофильных архей. В настоящее время экстремальных галофилов относят к домену *Archaea*, типу *Euryarchaeota*, классу *Halobacteria*. За последние 30 лет число их родов увеличилось до 20.

Большой интерес представляют три неординарных галофага, выделенные и охарактеризованные в последнем десятилетии XX в. — первом десятилетии XXI в.

Во-первых, это умеренный галофаг ϕ Ch1 из спонтанно лизировавшейся культуры галоалкалифильного археота *Natronobacterium magadii*, изолированный в 1997 г. группой немецких вирусологов во главе с Анжелой Витте. Он персистирует в хозяине в качестве интегрированного в хромосому профага. Длина его вириона составляет 200 нм, из которых 70 нм приходится на головку и 130 нм — на хвостовой отросток. Уникальность этого вируса состоит в том, что наряду с линейной dsДНК (55 тыс. п.н.) в состав зрелого вириона входит несколько молекул РНК (80–700 н.).

Во-вторых, это еще один, после His2, сферический галофаг — SH1 (сокр. от англ. *spherical halovirus* 1), обнаруженный в 2005 г. группой во главе с Дэнисом Бэмфордом в австралийском гипергалинном озере (>3М NaCl). Он вызывает литическую инфекцию у плеоморфных археотов *Halorubrum* sp. и *Haloarcula hispanica*. В недифференцированных клетках хозяина вирус SH1 активно размножается (до 200 частиц), что сопровождается лизисом клетки, тогда как дифференцированные клетки (галоцисты) устойчивы к заражению. Размер линейного генома этого вируса (56 идентифицированных ORF) составляет 30,9 тыс. п.н. Шаровидный вирион вируса SH1 диаметром 70 нм лишен хвостового отростка и содержит 11 типов структурных белков.

В-третьих, это уникальный галофаг HPRV-1 (сокр. от *Halorubrum pleomorphic virus* 1), выделенный в 2009 г. группой Дэниса Бэмфорда из гипергалинного австралийского озера. В состав плеоморфного оболочного вириона (44×55 нм) входит не dsДНК, как у всех остальных вирусов архей, а ssДНК. Этот вирус вызывает персистентную инфекцию, не интегрируясь в состав хромосомы, и зрелые частицы выходят из клетки в отсутствие лизиса.

Вирусы метаногенных архей. По числу известных представителей вирусы метаногенов значительно уступают вирусам экстремально галофильных архей; информация о них бедна и фрагментарна.

Первый литический фаг метаногенов, вирус PG, был обнаружен в 1984 г. Джузеппе Бертани. Следом за этим в 1986 г. был описан литический фаг PMS1. Хозяевами обоих вирусов служит *Methanobrevibacter smithii*.

В 1989 г. в культуре *Methanococcus voltae* штамм A3 были выявлены вирусоподобные частицы (англ. virus-like particle, VLP) размером 79×52 нм, содержащие кольцевую dsДНК (23 тыс. п.н.). К сожалению, работа в данном направлении также не была продолжена.

В 1989 г. Томас Лейсинджер (Т. Leisinger) с сотрудниками обнаружил и охарактеризовал литического фага ψ M1, хозяином которого служит термофильный (55–65°C) метаноген *Methanothermobacter thermautotrophicus* («*Methanobacterium thermoautotrophicus*»). На других термофильных видах этого рода данный вирус не размножается. В 1999 г. Джузеппе Бертани описал для культуры *Methanococcus voltae* PS явление общей трансдукции. Вслед за этим был выявлен и сам вектор — фильтрующийся агент VTA (сокр. (*Methanococcus*) *voltae* transfer agent), способный переносить фрагмент клеточной ДНК размером 4,4 тыс. п.н. VTA имеет веретеновидную форму, легко переходящую в плеоморфную; размер его кольцевого генома, способного интегрироваться в хромосому, составляет 23 тыс. п.н.

Вирус гипертермофилов. В 2007 г. группа французских вирусологов во главе с Клэр Гелэн) описала первого представителя вирусов, инфицирующих гипертермофильных эвриархеотов рода *Pyrococcus*, — вирусоподобную частицу (англ. virus-like particle, VLP),

которая получила название PAV1 (сокр. от «*Pyrococcus abyssi*» virus 1). Вирион фага PAV1 имеет лимонovidную форму (120×80 нм), снабжен коротким «хвостом» и содержит кольцевую dsДНК (18 тыс. п.н.), которая в большом числе плазмидных копий (до 60) персистирует в цитоплазме клетки-хозяина без интеграции в хромосому; пик выхода частиц в отсутствие лизиса приходится на стационарную фазу.

Согласно результатам, молекулярного секвенирования, геном вируса PAV1 содержит 28 генов, 25 из которых расположены на одной из нитей ДНК (что не встречается у других вирусов гипертермофильных архей, за исключением вируса PSV из сем. *Globuloviridae*).

Большинство генов вируса PAV1 уникальны, и их функция неизвестна, что дает основание отнести его к новому роду или даже семейству.

В 2011 г. выделен вирус TPV1 (*Thermococcus prieurii* virus 1), обнаруженный в гипертермофильной эвриархеоте, выделенной из глубоководного образца гидротермального источника, собранного на глубине 2700 м в Восточно-Тихоокеанском поднятии. TPV1 – первый вирус, выделенный и описанный из гипертермофильных эвриархеот рода *Thermococcus*. Частицы TPV1 имеют форму лимона (140 нм × 80 нм) и похожи на структуры, ранее описанные для фузелловидных и неклассифицированной вирусоподобной частицы PAV1. Инфицирование TPV1 не приводит к лизису хозяина, а репликация вируса может быть вызвана ультрафиолетовым облучением. TPV1 содержит двухцепочечную кольцевую ДНК длиной 21,5 т. п. н., которая также присутствует в большом количестве в свободной форме в клетке-хозяине. Геном TPV1 содержит 28 предполагаемых генов; белковые последовательности, кодируемые 16 из этих генов, не имеют значительного сходства с белками из общедоступных баз данных.

Задание 1. Используя лекционный и дополнительный материалы, определите названия вирусов экстремальногалофильных *Euryarchaeota*.

<u>Название вируса</u>	Морфология и размер вириона	Тип нуклеиновой кислоты; мол. %GC; размер генома	Хозяин	Тип инфекции
	Икосаэдрическая головка (?); несократимый хвостовой отросток (?)	Линейная dsДНК; –; –	<i>Halobacterium</i> sp. B10	–
	Икосаэдрическая головка (58 нм); сократимый хвостовой отросток (94 нм)	Линейная dsДНК; 55,8%; 75,9 тыс п.н.	<i>Haloarcula</i> sp.; <i>Halobacterium salinarium</i> ; <i>Haloferax volcanii</i>	Литический фаг
	Икосаэдрическая головка (58 нм); сократимый хвостовой отросток (94 нм)	Линейная dsДНК, 55,8%; 77,7 тыс п.н.	<i>Halorubrum coriense</i> ; <i>Halobacterium saccharovorum</i>	То же
	Икосаэдрическая головка (60 нм); несократимый хвостовой отросток (100 нм)	Линейная dsДНК; 67%; 37,6 тыс п.н.	<i>H. salinarium</i>	Выход фага в отсутствие лизиса
	Икосаэдрическая головка (75 нм); несократимый хвостовой отросток (50 нм)	Линейная dsДНК; 62%; 29,6 тыс п.н.	То же	То же

	Веретеновидный (44×74 нм)	Линейная dsДНК; 40%; 14,5 тыс п.н.	<i>Halobacterium cutirubrum</i> ; <i>Halorubrum hispanica</i>	Литический или персистирующий фаг
	Сферический (62 нм)	Линейная dsДНК; –; 16,1 тыс п.н.	<i>H. hispanica</i>	То же
	Икосаэдрическая головка (50 нм); сократимый хвостовой отросток (120 нм)	Линейная dsДНК; –; –	<i>H. salinarium</i>	—"
	Икосаэдрическая головка (90 нм); сократимый хвостовой отросток (150 нм)	Линейная dsДНК; –; 23 тыс п.н.	<i>H. cutirubrum</i> ; <i>H. salinarium</i>	–
	Икосаэдрическая головка (40 нм); несократимый хвостовой отросток (70 нм)	Линейная dsДНК; –; –	<i>H. salinarium</i>	Литический фаг
	Икосаэдрическая головка (?); сократимый хвостовой отросток (?)	Линейная dsДНК; –; –	То же	–
	Сферический оболочный (50 нм)	Линейная dsДНК; –; 27 тыс п.н.	<i>H. hispanica</i>	Литический фаг
	Икосаэдрическая головка (70 нм); сократимый хвостовой отросток (130×20 нм)	Линейная dsДНК; 62%; 58,5 тыс п.н.; цитозин частично метилирован	<i>Natrialba magadii</i>	Умеренный фаг
	Икосаэдрическая головка (64 нм); сократимый хвостовой отросток (170 нм)	Линейная dsДНК; 65%; 59 тыс п.н.	<i>H. salinarium</i>	Литический или персистирующий фаг
	Икосаэдрическая головка (55 нм); несократимый хвостовой отросток (80 нм)	Линейная dsДНК; 70%; 56 тыс п.н.; цитозин полностью метилирован	То же	Умеренный фаг

Задание 2. Используя лекционный и дополнительный материалы, определите названия метаногенных вирусов *Euryarchaeota*.

<u>Название вируса</u>	Морфология и размер вириона	Тип нуклеиновой кислоты; мол %GC; размер генома	Хозяин	Тип инфекции
	Икосаэдрическая головка (?); несократимый (?) хвостовой отросток (?)	Линейная dsДНК; –; 50 тыс. п.н.	<i>Methanobrevibacter smithii</i>	Литический фаг
	То же	Линейная dsДНК; –; 35 тыс. п.н.	То же	То же

	Эллипсоидный (52×70 нм); короткий хвостовой отросток	Линейная (пермутирующая в кольцо) dsДНК; –; 23 тыс. п.н.	<i>Methanococcus voltae</i> A3	Умеренный фаг
	Икосаэдрическая головка (40 нм); несократимый хвостовой отросток (61 нм)	–; –; –	<i>M. voltae</i> PS	То же
	Икосаэдрическая головка (70 нм); несократимый хвостовой отросток (160 нм)	Линейная dsДНК, –; 85 тыс. п.н.	<i>Methanothermobacter thermautotrophicus</i>	Литический фаг
	Икосаэдрическая головка (55 нм); несократимый хвостовой отросток (230 нм)	Линейная (пермутирующая в кольцо) dsДНК; –; 36 тыс. п.н.	То же	То же
	Икосаэдрическая головка (55 нм); несократимый хвостовой отросток (210 нм)	Линейная (пермутирующая в кольцо) dsДНК; –; 30,4 тыс. п.н.	— —	— —
	То же	Линейная dsДНК; 46,3%; 26,1 тыс. п.н.	— —	— —

Теоретическая часть

Вирусы архей типа *Crenarchaeota*. Вирусы кренархеотов чаще всего имеют оболочку; они исключительно разнообразны в морфологическом и генетическом отношении. Размер генома у них составляет 15–75 тыс. п.н. Все известные представители этой группы содержат dsДНК — кольцевую (15–75 тыс. п.н.) или линейную (25–45 тыс. п.н.). Способность инкапсидировать линейную dsДНК, которой обладают вирусы из семейств *Lipothrixviridae* и *Rudiviridae*, не имеет аналогий. Кольцевой вирусный геном может кодировать интегразу, что позволяет ему встраиваться в хозяйскую хромосому, в то время как в линейном геноме ген интегразы отсутствует и интеграции не происходит. Хозяевами вирусов выступают (ан)аэробные представители порядка *Sulfolobales*: *Acidianus*, *Pyrobaculum*, *Sulfolobus* и *Thermoproteus*, а также *Aeropyrum pernix* — аэробный представитель порядка *Desulfurococcales*. Они заселяют материковые, островные, морские и океанические гидротермы (60–90°C; pH 1–9), широко распространенные в обоих полушариях.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №11 (1,2).

ВИРУСЫ ПРОТИСТОВ, ГРИБОВ И ВОДОРОСЛЕЙ. ВИРУСЫ ПРОТИСТОВ И ВОДОРОСЛЕЙ, СОДЕРЖАЩИЕ ГЕНОМНУЮ DSDНК. ВИРУСЫ ПРОТИСТОВ, ГРИБОВ И ВОДОРОСЛЕЙ, СОДЕРЖАЩИЕ ГЕНОМНУЮ DSPHK. ВИРУСЫ ПРОТИСТОВ И ГРИБОВ, СОДЕРЖАЩИЕ ГЕНОМНУЮ SSPHK(+).

Цель работы: определить отличительные признаки вирусов протистов и водорослей, содержащие геномную DSDНК, DSPHK, SSPHK(+), изучить биологию, экологию и разнообразие представителей семейств.

Ход работы:

Теоретическая часть

Вирусы протистов и водорослей, содержащие геномную dsДНК. У некоторых вирусов водорослей геном представляет собой линейную dsДНК. Эти вирусы относятся к двум семействам – *Mimiviridae* и *Phycodnaviridae*.

Семейство *Mimiviridae*. Представители данного семейства – это крупные нефилтрующие и медленно размножающиеся вирусы, что долго не позволяло выявить их традиционными вирусологическими методами. В то же время, как показывает метагеномный анализ образцов воды из разных областей Мирового океана, биоразнообразие семейства *Mimiviridae* может оказаться весьма значительным. В частности, для 43% генов «ядра» генома мимивирусов обнаружены близкие гомологи в базе данных, составленной по результатам секвенирования анонимных последовательностей ДНК из планктона Саргассова моря; вероятно, основными хозяевами этих вирусов служат морские водоросли.

Вместе с вирусом натуральной оспы (сем. *Poxviridae*) и хлоровирусами (сем. *Phycodnaviridae*) мимивирусы принадлежат к группе NCLDV (сокр. от англ. **n**ucleo-**c**ytoplasmic **l**arge **D**N **A** **v**iruses), которые имеют многослойную оболочку и геном в 200–300 тыс. п.н. и даже 1200 тыс. п.н. Из-за особо крупного размера их еще называют **гигантами** (сокр. англ. **g**igantic virus).

Семейство *Phycodnaviridae*. Это архаичное и, несмотря на морфологическое единообразие, генетически гетерогенное семейство вирусов, инфицирующих водоросли. Они контролируют онтогенез и популяционные циклы своих хозяев, что во многом определяет масштаб их экологического значения. Тем более досадно, что выявлено всего 200 фиковирусов; геном секвенирован только у десяти из них и лишь единственный представитель этой группы (вирус PBCV-1) изучен более или менее подробно.

В настоящее время к семейству *Phycodnaviridae* относят 6 родов, названных в соответствии с родовыми именами хозяев: *Chlorovirus*, *Coccolithovirus*, *Phaeovirus*, *Prasinovirus*, *Prymnesiovirus* и *Raphidovirus*.

Вирусы протистов, грибов и водорослей, содержащие геномную dsРНК. В данную группу входят представители шести вирусных семейств: *Chrysoviridae*, *Endornaviridae*, *Hypoviridae*, *Partitiviridae*, *Reoviridae* и *Totiviridae*.

Семейство *Chrysoviridae*. В этом семействе есть единственный род *Chrysovirus*, который раньше относили к семейству *Partitiviridae*. Однако теперь установлено, что связь между хризовирусами и партитивирусами весьма отдаленная.

Хозяевами вирусов рода *Chrysovirus* являются грибы; наиболее часто это плесневый гриб *Penicillium chrysogenum* (от видового эпитета которого произведено родовое название этого вируса). Инфекция протекает бессимптомно; цикл размножения практически такой же, как у вирусов рода *Partitivirus*.

Геном хризовируса состоит из четырех молекул dsРНК (2,8–3,6 тыс. п.н.), каждая из которых кодирует отдельный белок – главный белок капсида, RdRP и минорный белок капсида; функция четвертого белка не установлена.

Семейство *Endornaviridae*. В данном семействе существует единственный род *Endornavirus*. Его представители инфицируют культивируемые однодольные и двудольные растения, в частности овес (*Avena sativa*), бобы (*Vicia faba*) и фасоль (*Phaseolus vulgaris*). Помимо растений хозяевами эндорнавирусов могут быть оомицеты рода *Phytophthora* и базидиомицеты рода *Helicobasidium*.

Эндорнавирус не образует вирионов и реплицируется в цитоплазматических везикулах в виде инфекционной РНК-плазмиды (>10 тыс. п.н.), кодирующей только один полипептид – РНК-зависимую РНК-полимеразу (RdRP), в котором имеются характерные мотивы геликазы.

Передается эндорнавирус горизонтально, при половом процессе.

Семейство *Hypoviridae*. В этом семействе описан единственный род *Hypovirus*; в нем четыре вида.

Хозяином гиповируса служит патогенный гриб *Cryphonectria parasitica*, возбудитель рака коры каштана (*Castanea sativa*); он неоднократно вызывал эпидемию в североамериканской популяции этого растения. Так, в 1950 г. им было погублено около 4 млн взрослых деревьев.

Грибы, зараженные гиповирусом, проявляют ослабленную вирулентность, или **гиповирулентность** (англ. hypovirulence). Гиповирусная инфекция принадлежит к персистентному типу, и фенотип хозяина вполне стабилен.

Как у большинства вирусов грибов, в жизненном цикле гиповируса отсутствует внеклеточная фаза, и он репродуцируется как dsРНК (12–13 тыс. п.н.; 3'-конец плюсниги полиаденилирован), ассоциированная с мембранными везикулами диаметром 50–80 мкм. Геном гиповируса содержит одну–две ORF (А и В). ORF-А, которая присутствует не у всех гиповирусов, кодирует два полипептида (один из них отвечает за снижение вирулентности гриба-хозяина). В свою очередь, ORF-В кодирует препротейн с доменами высокоточной РНК-полимеразы RdRP и геликазы.

Семейство Partitiviridae. У представителей этого семейства геном сегментирован, т. е. распределен между разными молекулами РНК, находящимися внутри одного капсида. Это также партитивный геном, поскольку сегменты могут упаковываться в разные капсиды. Последнее обстоятельство отражается в названии семейства (лат. partitus – разделенный).

Известно четыре рода партитивирусов. Два из них, *Alphacryptovirus* и *Betacryptovirus*, инфицируют растения, в частности клевер (*Trifolium pratense*); ранее эти рода относили к ныне упраздненному семейству Cryptoviridae. Третий род, *Partitivirus*, заражает грибы. Хозяином четвертого рода, *Cryspovirus*, служит споровик *Cryptosporidium parvum*. Вирусы с dsРНК, принадлежащие к группе партитивирусов, обнаружены также у морских зеленых водорослей рода *Bryopsis*.

В жизненном цикле партитивирусов отсутствуют литическая и внеклеточная стадии. Для хозяев, базидиомицетов или аскомицетов (вирус найден у представителей 15 родов этих грибов), инфекция протекает бессимптомно. Латентный характер инфекции указывает на коэволюцию партитивируса и гриба. Поскольку передача вируса через окружающую среду невозможна, его судьба целиком зависит от жизнеспособности хозяина.

Семейство Reoviridae. К семейству *Reoviridae* в основном принадлежат вирусы животных, но к роду *Mycoreovirus* относятся вирусы грибов. Они репродуцируются в мицелии хозяев – *Rosellinia necatrix* и *Cryphonectria parasitica* (класс Sordariomycetes, отдел Ascomycota).

Икосаэдрические вирионы реовирусов грибов имеют диаметр около 80 нм. Их геном состоит из 11–12 сегментов dsРНК суммарным размером ~23 тыс. п.н. (род *Mycoreovirus*) и ~25,5 тыс. п.н. (род *Mimoreovirus*).

В каждом вирионе имеется по одной копии сегментов генома; каждый сегмент содержит одну рамку считывания.

После проникновения вируса в клетку его RdRP синтезирует с каждого сегмента кэпированную мРНК, которая экспортируется в цитоплазму на предмет трансляции. Часть молекул мРНК снова упаковывается в капсиды; там осуществляется транскрипция и восстанавливается исходная двунитевая структура генома. Зрелые вирионы покидают клетку после разрушения цитоплазматической мембраны и клеточной стенки.

Семейство Totiviridae. В данное семейство (от лат. totus — цельный; *имеется в виду, что геном этих вирусов не сегментирован*) входят три рода: *Giardiavirus*, *Leishmanivirus* и *Totivirus*.

К роду *Giardiavirus* принадлежат два вида вирусов протистов — *Giardia lamblia virus* (GLV) и *Trichomonas vaginalis virus* (TvV).

Представители рода *Leishmanivirus* персистируют в клетках паразитического протиста рода *Leishmania* (отряд Kinetoplastida).

Вirusы рода *Totivirus* чаще всего инфицируют грибы. В нем описано три вида: вирус дрожжей из отдела Ascomycota — *Saccharomyces cerevisiae virus* (ScV), вирус возбудителя пузырчатой головни из отдела Basidiomycota — *Ustilago maydis virus* (UmV) и вирус возбудителя гельминтоспориоза из отдела Ascomycota — *Helminthosporium victoriae virus* (HvV). Кроме того, тотивирусы встречаются у протистов-споровиков *Babesia bovis* и *Eimeria stiedae*.

Вirusы протистов и грибов, содержащие геномную ssPHK(+). В данную группу входят представители пяти родов — *Alphaflexiviridae*, *Gammaplexiviridae*, *Barnaviridae*, *Narnaviridae* и *Virgaviridae*.

Семейства *Alphaflexiviridae* и *Gammaplexiviridae*. Главными хозяевами флексивирuсов служат растения. Тем не менее недавно открыты вирусy родов *Botrexvirus* и *Sclerodarnavirus* (сем. *Alphaflexiviridae*) и *Mycoflexivirus* (сем. *Gammaplexiviridae*), которые инфицируют грибы.

Семейство *Barnaviridae*. В этом семействе только один род — *Barnavirus*. Хозяином барнавирuсов служит промышленно культивируемый гриб *Agaricus bisporus* (шампиньон). Они вызывают у него болезнь «La France», которая проявляется в замедленном росте и укороченной жизни мицелия, а также в деформации плодовых тел. Вывести устойчивый к вирусy сорт *A. bisporus* не удается.

Барнавирус — это единственный известный палочковидный вирус грибов; его вирион имеет размер 50×20 нм.

Геном барнавирuса представлен линейной ssPHK(+) размером 4 тыс. н.; кэп на 5'-конце и полиА-хвост на 3'-конце отсутствуют. Он содержит гены четырех белков (капсидного белка; RdRP; белка, участвующего в репликации; белка с неизвестной функцией) и три дополнительные рамки считывания. Все ли они экспрессируются *in vivo*, не выяснено.

Распространяется барнавирус горизонтально — через мицелий и базидиоспоры.

Семейство *Narnaviridae*. Virusы рода *Narnavirus*, хозяином которых служат дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, представлены двумя видами инфекционных ssPHK(+) с константой седиментации, соответственно, 20S и 23S (~2,5 тыс. н.). Они не образуют капсид (единственная ORF кодирует RdRP, отвечающую за репликацию вирусного генома в цитоплазме дрожжей) и передаются либо вертикально, в ряду вегетативных поколений, либо горизонтально, при скрещивании разных штаммов хозяина.

Virusы рода *Mitovirus*, сходные с нарнавирuсами, недавно обнаружены у грибов *Botrytis*, *Cryphonectria* и *Ophiostoma*. Их геномная (+)PHK примерно такого же размера (2,5–2,9 тыс. н.).

Вirusы протистов в семействе *Virgaviridae*. Основными хозяевами виргавирuсов (лат. *virga* — они используют в качестве промежуточного хозяина для своего расселения).

Представители нескольких родов этого семейства (*Benevirus*, *Furovirus*, *Pecluvirus* и *Potomavirus*) инфицируют протистов из класса Plasmodiophorea (фила Rhizaria; отдел Cercozoa), паразитирующих на корнях злаков или на клубнях бобовых, картофеля и свеклы; они также обнаружены в ассимилирующих тканях указанных растений.

Частицы виргавирuсов выявляются только внутри клеток; внеклеточная стадия отсутствует. В растениях вирионы могут находиться как в цитоплазме, так и в вакуолях. Одним из симптомов инфекции служит изменение окраски листьев и стеблей, поскольку при размножении вируса повреждаются хлоропласты.

Вирион виргавирuсов диаметром 20 нм имеет спиральный тип симметрии и состоит из двух частей длиной, соответственно, 140–160 нм и 260–300 нм (у *Benevirus* — до 390 нм).

Задания 1. Выделите и охарактеризуйте вирусy протистов и водорослей.

Ход работы:

1) Получить образцы зараженных протистов и водорослей;

2) Используйте методы ультрацентрифугирования и/или градиента сахарозы для выделения и очистки вирусных частиц.

3) Извлечение вирусной ДНК и использование методов на основе ПЦР, таких как ПЦР-ПДРФ или метагеномное секвенирование, для определения генетического разнообразия вирусов в образцах;

4) Используйте ПЦР и секвенирование для определения конкретных семейств присутствующих вирусов, уделяя особое внимание *Mimiviridae* и *Phycodnaviridae*;

5) Изучите влияние вирусов на рост и выживание простейших и водорослей, используя такие методы, как культивирование клеток и микроскопическое наблюдение;

6) Сравните геномные особенности вирусов, выделенных из простейших и водорослей, с известными вирусами семейств *Mimiviridae* и *Phycodnaviridae*, используя инструменты биоинформатики, такие как BLAST и выравнивание последовательностей.

Примечание. Конкретные методы, материалы и условия для этого эксперимента могут различаться в зависимости от настройки лаборатории и наличия ресурсов.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 12 (1). ВИРУСЫ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ (ФИТОВИРУСЫ). ОСНОВНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ФИТОВИРУСОВ. МЕТОДЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ФИТОВИРУСОВ. СИМПТОМЫ ФИТОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ. СПОСОБЫ ЗАРАЖЕНИЯ ФИТОВИРУСАМИ. ПУТИ РАСПРОСТРАНЕНИЯ ФИТОВИРУСОВ В ТЕЛЕ РАСТЕНИЯ.

Цель работы: разобраться в основных характеристиках и особенностях фитовирусов, а также изучить способы культивирования, заражения и распространения этих вирусов в высших растениях.

Ход работы:

Теоретическая часть

Относительно слабая изученность фитовирусов имеет не только такую «субъективную» причину, как неактуальность их для медицины, но и связана со спецификой строения растений на клеточном и тканевом уровнях.

Вирион фитовирусов. У разных представителей фитовирусов вирионы различаются по форме. Однако в настоящее время она не считается главным критерием при разграничении семейств или порядков.

Вирионы фитовирусов могут быть безоболочными и оболочными; изометрическими (сферическими или продолговатыми); спирально-симметричными (жесткими или гибкими); палочковидными; пулевидными. Наконец, представители семейства *Narnaviridae* вообще не образуют капсида.

Геном фитовирусов. Размер генома у всех изученных РНК-содержащих фитовирусов варьирует в пределах от 2,5 тыс. н. (сем. *Narnaviridae*) до 20 тыс. н. (сем. *Closteroviridae*); среднее значение составляет 4–6 тыс. н. В свою очередь, геном ДНКсодержащих фитовирусов имеет размер от 4,8 тыс. п.н. (сем. *Geminiviridae*) до 7–8 тыс. п.н. (семейство *Caulimoviridae*).

Геномы фитовирусов бывают несегментированными, сегментированными, унипартитными и мультипартитными, причем в одном и том же семействе могут встречаться все перечисленные варианты геномов (примером служит сем. *Virgaviridae*). Широкому распространению мультипартитных вирусов благоприятствуют персистентный характер инфекции и передача агента насекомыми.

Особенности проникновения и транслокации. В нормальных условиях стенка растительной клетки представляет собой массивный и очень жесткий каркас целлюлозных фибрилл в аморфном матриксе, который состоит в первую очередь из гемицеллюлоз и пектина; в зависимости от типа ткани матрикс может дополнительно содержать лигнин, кутин, суберин, белки и воски. Различают первичные и вторичные клеточные стенки.

Преодоление барьера клеточной стенки; роль плазмодесм. У фитовирусов нет ферментов, которые могли бы разрушить клеточную стенку хозяина, поэтому им приходится ее «обходить». Более того, на пути проникновения и распространения в организме-хозяине фитовирусы не преодолевают цитоплазматическую мембрану (в отличие от бактериофагов и вирусов животных).

Роль проводящей системы в транслокации фитовирусов. Проводящая система функционально интегрирует ткани и органы растительного организма и подразделяется на ксилему (англ. *xylem*; от греч. *xylon* – древесина), которая транспортирует воду и минеральные ионы от корней к надземным частям, в частности к ассимилирующим тканям, и флоэму (англ. *phloem*; от греч. *phloios* – луб), которая переносит ассимиляты в корни, в зоны роста, к зреющим плодам и т. д., т. е. в места их непосредственной утилизации или запасаания.

Специфичность фитовирусов. Отсутствие рецепторов на поверхности растения в сочетании с особыми механизмами инвазии позволяют фитовирусам инфицировать очень широкий круг хозяев.

Биоразнообразие и систематика фитовирусов. В настоящее время насчитывается свыше 2000 видов фитовирусов, и можно предположить, что их на самом деле на порядок больше. Среди известных штаммов 77% выделено от культурных растений, что объясняется не биологическими причинами, а практическим значением соответствующих хозяев.

Методы культивирования фитовирусов. Заражение модельных растений можно осуществлять биологическими или механическими способами. Биологические способы инфицирования обычно применяются по отношению к древесным растениям. Самый распространенный из них — это прививка, которая производится либо путем контактного сближения индивидуально укорененных растений (одно из которых инфицировано), либо путем пересадки инфицированного привоя. Более простой, но не всегда эффективный, метод основан на использовании паразитического растения — повилики (*Cuscuta europaеа*), которая образует гаустории, проникающие через поверхностные ткани в проводящие пути заражаемого растения; с ее помощью удастся перенести инфекцию между взаимно удаленными формами. Особенно успешно передаются вирус мозаики огурца (*Cucumber mosaic virus*, CMV) и вирус погрелковости табака (*Tobacco rattle virus*, TRV).

Механическое инфицирование растения осуществляют, втирая суспензию вирусных частиц или сока инфицированного растения тампоном, шпателем или щеткой. Для заражения большого числа особей или высокорослых растений с жесткими листьями обычно применяется пульверизатор, распыляющий смесь вирусной суспензии с зернами абразива.

Симптомы фитовирусной инфекции. К локальным симптомам прежде всего относятся:

- **некрозы** (специфически расположенные омертвевшие белесые, черные, бурые или красные зоны);
- **хлорозы** (пятна в отдельных участках листовой пластинки, имеющие, по сравнению с фоном, более светлую, желтоватую или розоватую окраску).

Системные симптомы более разнообразны:

- **гравировка** (зоны отмирания клеток паренхимы);
- **деформации** (патологический рост в форме опухолей; разрастание верхушечных почек; морщинистость, курчавость, нитевидность и скручивание листовой пластинки; махровость цветков; искажение формы плодов и т. д.);
- **израстание** (пролиферация или сращивание вегетативных и генеративных органов, образование множественных боковых побегов или нескольких стеблей из одного узла; превращение частей цветка в листовидные образования);

- **карликовость** (угнетение роста; уменьшение числа побегов и листьев; мелкоплодие);
- **мозаики** (чередование разноокрашенных зон на листьях, цветках или плодах, причем в зависимости от формы, окраски и взаимного расположения таких зон различают жилковатую, желтую, белую и полосатую мозаику, а также кольцевую пятнистость, крапчатость, линейный узор, пестролистность, сетчатость и т. д.);
- **увядание** (потеря тургора побегами, цветками или плодоножками; она возникает не только при вирусном поражении сосудистой или корневой системы, но и в результате вторичного воздействия стрессовых факторов).

Способы заражения фитовирусами. Как уже отмечалось, фитовирусы не содержат ферментов, способных разрушить поверхностную кутикулу и ригидную клеточную стенку. Поэтому первичное проникновение возможно либо только в зоне механического повреждения или мацерации, либо в результате инъектирования вирусных частиц в клетки или проводящую систему с помощью ротового аппарата растительноядных насекомых.

Случайные механические повреждения эпидермы и коры возникают постоянно, даже при трении надземных органов растения друг о друга. Плотного контакта корней также бывает достаточно для их поверхностного повреждения, благодаря чему вирусы проникают в клетки паренхимы.

Растительноядные животные и мелкие грызуны не выступают собственно векторами, однако они могут наносить механические повреждения органам и тканям растения, что обеспечивает проникновение фитовирусов.

Особенно опасны вирусы, передающиеся механическим путем при сгущенности посевов. Любые манипуляции с вегетативными органами растения (обрезка, пикировка, прививка, прореживание и т. д.) могут способствовать быстрому распространению инфекции. Фитовирусы длительное время, нередко более сезона, сохраняются в растительных останках, и поэтому поврежденные растения и их отдельные части предпочтительно уничтожать, а не компостировать.

Пути распространения фитовирусов в теле растения. В 1934 г. австралийский вирусолог Джефффри Сэмюэль (G. Samuel) в своих классических опытах с вирусом табачной мозаики (TMV) показал, что инфекция распространяется из зоны первичного заражения по проводящей системе; в конечном счете заражаются молодые и старые листья, верхние и боковые побеги, а также корни.

При вирусной болезни агент должен распространиться из первоначально инфицированной в остальные части растения. Такой процесс, или системная инфекция (англ. systemic infection), осуществляется в несколько этапов, причем вирус использует структуры растения, которые в норме служат для транспорта эндогенных макромолекул.

Сначала либо вирион, либо специализированный нуклеопротеиновый комплекс доставляются из сайта репликации, которым служит участок эндоплазматического ретикулума, к плазмодесме; это так называемый **внутриклеточный транспорт** (англ. intracellular movement). Затем вирус проходит сквозь плазмодесму и попадает в соседнюю клетку; это так называемый **межклеточный транспорт** (англ. cell-to-cell movement). Наконец, вирус передается по сосудистой системе, обычно по ситовидным трубкам флоэмы от органа к органу; это так называемый **дистанционный транспорт** (англ. long-distance movement).

Задание 1. Изучить симптомы фитовирусной инфекции растений, пути заражения и распространения фитовирусов в организме исследуемых растений.

Ход работы:

- 1) Получите образцы здоровых и зараженных растений из запасов лаборатории или из поля;
- 2) Изучите симптомы фитовирусной инфекции в образцах зараженных растений. Делайте подробные заметки о появлении и расположении симптомов;

- 3) Определите способ заражения, наблюдая за распространением вируса в теле растения и исследуя растительный сок на наличие вируса серологическими методами;
- 4) Изучите пути распространения вируса в организме растения, наблюдая за распределением вирусных частиц во флоэме, ксилеме и других тканях растения;
- 5) Проанализируйте влияние вируса на рост и развитие растений, сравнив рост инфицированных и здоровых образцов растений.

Примечание. Конкретные методы, материалы и условия для этого эксперимента могут различаться в зависимости от настройки лаборатории и наличия ресурсов.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 12 (2). БИОРАЗНООБРАЗИЕ ФИТОВИРУСОВ.

Цель работы: изучение биоразнообразия и особенностей фитовирусов; получить знания о различных типах фитовирусов на основе их геномной структуры, получить понятие о вирусоподобных агентах – вироидах, рассмотреть классификацию и особенности биологии фитовирусов с геномной ssРНК(–) и фитовирусов с геномной dsДНК, имеющие стадию обратной транскрипции. Рассмотреть методы борьбы с фитовирусными инфекциями.

Ход работы:

Теоретическая часть

У подавляющего большинства фитовирусов геномной нуклеиновой кислотой является РНК. Что касается ДНК-содержащих представителей, то они относятся только к двум семействам – *Caulimoviridae* (dsДНК-фитовирусы) и *Geminiviridae* (ssДНК-фитовирусы).

Отметим, что у фитовирусов семейства *Caulimoviridae* в репликативном цикле есть стадия обратной транскрипции, в то время как dsДНК-фитовирусы, геном которых реплицировался бы с помощью ДНК-зависимой ДНК-полимеразы, не обнаружены. **Фитовирусы с геномной ssДНК. семейство *Geminiviridae*.** Фитовирусы, содержащие ssДНК, образуют вирионы разной морфологии, а также различаются по структуре генома и стратегии его репликации. Эти ведущие таксономические признаки варьируют даже на уровне родов одного и того же семейства.

Эти фитовирусы распространены по всему Земному шару и впервые описаны в ходе обширных эпифитотий. Они поражают однодольные и двудольные растения, нанося ощутимый вред мировому сельскому хозяйству.

В то же время такие вирусы ценны как векторы, используемые при проведении молекулярно-биологических исследований, а их генетические элементы применяются в генной инженерии.

Название семейства фитовирусов *Geminiviridae* объясняется тем, что их вирионы соединяются попарно (лат. *geminī* – близнецы).

Фитовирусы с геномной dsрнк. Представители этой, относительно небольшой, группы фитовирусов принадлежат к семейству *Reoviridae*. К фитореовирусам относятся виды родов *Fijivirus*, *Oryzavirus* и *Phytoreovirus*. Они распространены в Азии (преимущественно в южном Китае и Японии), а также в Африке и Северной Америке. К наиболее изученным представителям данной группы относятся вирус карликовости риса (RDV) и вирус раневых опухолей (WTV).

Фитореовирусы инфицируют как однодольные, так и двудольные растения. Симптомами заболевания служат галлы на листьях, наросты на стеблях и опухоли на корнях, а также гиперплазия флоэмы.

Реовирус RDV вызывает полосатость листа у однодольных растений. В свою очередь, реовирус WTV, заражающий свыше 50 видов бобовых, индуцирует образование небольших опухолей на стеблях, а также крупных опухолей на корнях; при инфекции лобелий (*Lobelia* sp.) и некоторых других декоративных растений наблюдается

аномальный морфогенез, например, на нижней стороне листовой пластинки образуется дополнительный лист.

Для фитореовирусов характерен персистентный тип инфекции; они распространяются цикадками (в которых размножаются), причем насекомое сохраняет инфекционность всю жизнь, т. е. 10–20 дней. Фитореовирусы способны инфицировать растения только с помощью вектора; механически передать инфекцию не удается.

Фитовирусы с геномной ssрнк(+). Эта группа фитовирусов наиболее разнообразна и насчитывает свыше десяти семейств, к которым принадлежит 65% изолятов.

Репликация и упаковка геномной РНК исключительно специфичны (последняя безошибочно выбирается из множества типов РНК, присутствующих в клетке); они чаще всего регулируются не на уровне первичных последовательностей, а на уровне вторичных структур (петель, тРНК-подобных шпилек и псевдоузлов), которые способны взаимодействовать только с вирусными ферментами и структурными белками.

Семейства *Alphaflexiviridae* и *Betaflexiviridae*. Три семейства флексивирусов – *Alphaflexiviridae*, *Betaflexiviridae* и *Gammaflexiviridae*, получили названия из-за характерной формы гибких нитевидных вирионов (от лат. *flexilis* – гибкий). Хозяевами альфа-флексивирусов служат растения или грибы, бета-флексивирусов – только растения, тогда как гамма-флексивирусы паразитируют исключительно на грибах.

В настоящее время выделяют четыре рода альфафлексивирусов (*Allexivirus*, *Lolavirus*, *Mandarivirus* и *Potexvirus*) и шесть родов бетафлексивирусов (*Capillovirus*, *Carlavirus*, *Citivirus*, *Foveavirus*, *Trichovirus* и *Vitivirus*).

Общими признаками фитофлексивирусов являются:

- нитевидные гибкие вирионы размером 400–1000×12–13 нм;
- капсид, построенный из белка единственного типа (22–44 кДа);
- монопартитный геном на основе кэпированной и полиаденилированной РНК(+), содержащий до шести частично перекрывающихся ORF;
- трансляция хотя бы одной из ORF с субгеномной РНК;
- препротейн (150–250 кДа), транслируемый с ORF1, продуктами процессинга которого являются RdRP, геликаза и метилтрансфераза.

Семейство *Bromoviridae*. название данного семейства производится от крапчатой болезни люцерны *Medicago sativa* (alfalfa) (англ. **broad bean mottle**).

В семейство *Bromoviridae* входят рода *Alfamovirus*, *Bromovirus*, *Cucumovirus*, *Ilarvirus* и *Oleavirus*.

Бромовирусы инфицируют представителей девяти семейств однодольных и двудольных растений, причиняя большой вред многим сельскохозяйственным культурам. В частности, виды рода *Alfamovirus* заражают бобовые, рода *Bromovirus* преимущественно злаковые и бобовые, виды рода *Cucumovirus* — бобовые; родов *Ilarvirus* и *Oleavirus* — широкий круг древесных растений, в том числе плодовые культуры.

Следует отметить, что круг хозяев у разных представителей рода *Cucumovirus* довольно узкий — обычно это растения одного рода, хотя вирус мозаики огурцов (CMV) инфицирует очень широкий круг растений, вызывая у них деформацию листьев и плодов, карликовость, мозаичность окраски и некрозы.

Представители родов *Bromovirus*, *Cucumovirus* и *Ilarvirus* образуют икосаэдрические вирионы диаметром 26–35 нм. Это трипартитные вирусы; два сегмента их генома (РНК1 и РНК2) упаковываются в разные частицы. Третья геномная РНК (РНК3) упаковывается совместно с субгеномной РНК4.

Представители родов *Alfamovirus* и *Oleavirus*, а также некоторые иларивирусы образуют бациллоподобные вирионы размером 18×5 нм. Это тетрапартитные вирусы; три частицы содержат по одной копии РНК1, РНК2 и РНК3, а четвертая — две копии РНК4.

Семейство *Potyviridae*. Название данного семейства происходит от сокращенного названия типового вида, Y-вируса картофеля (*Potato virus Y*).

В состав семейства *Potyviridae* входят шесть родов: *Bymovirus*, *Ipomovirus*, *Macluravirus*, *Potyvirus*, *Rymovirus* и *Tritimovirus*. Самый крупный род, *Potyvirus*, содержит более 90 признанных и почти столько же нелегитимных видов.

Потивирусы вызывают болезни, сопровождающиеся значительными потерями урожая многих сельскохозяйственных культур: бахчевых (арбуз, кабачки и др.), полевых (сахарный тростник, сорго и др.), огородных (горох, фасоль и др.) и садовых (папайя, слива и др.). Кроме того, они влияют на рост и изменяют внешний вид декоративных растений, в частности тюльпанов.

Симптомами инфекции служат: 1) угнетенный и уродливый рост; 2) некрозы; 3) опадание плодов; 4) хлорозы и мозаичность. Ультраструктурным признаком потивирусной инфекции является образование в цитоплазме цилиндрических включений, состоящих из агрегированных вирионов.

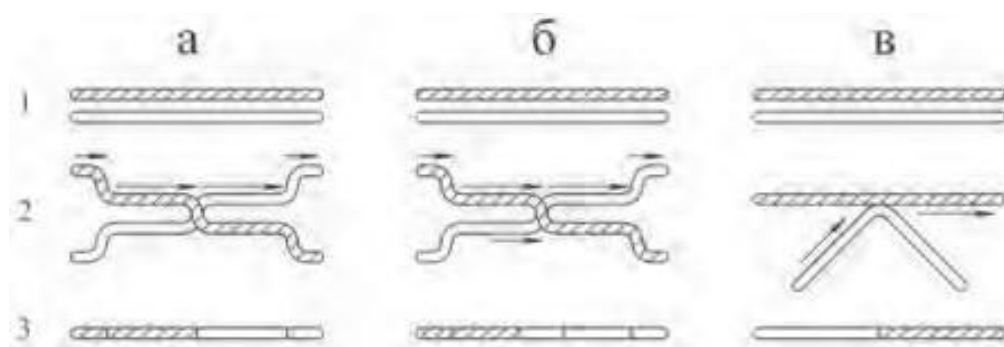
Семейство *Virgaviridae*. Данное семейство, название которого отражает палочковидную форму вирионов (лат. *virga* – палка), было официально признано Международным комитетом по таксономии вирусов (ICTV) только в 2008 г.

К виргавирусам относятся рода *Furovirus*, *Hordeivirus*, *Pecluvirus*, *Pomovirus*, *Tobamovirus* и *Tobravirus*. Типовой вид рода *Tobamovirus*, вирус табачной мозаики (TMV), — самый знаменитый и до сих пор актуальный модельный объект вирусологии и фитопатологии.

Рода виргавирусов различаются, в частности, по числу используемых белков движения — это либо единственный белок молекулярной массой ~30 кДа, либо три белка, гены которых локализуются вблизи 3'-конца РНК(+).

Виргавирусы могут инфицировать новых хозяев при механическом повреждении последних (для тобамовирусов этот путь единственный) или с помощью векторов. Представители родов *Furovirus*, *Pecluvirus* и *Pomovirus* переносятся протистами, виды рода *Hordeivirus* — нематодами. Гордеивирусы и пеклуривирусы могут также передаваться с семенами. Круг хозяев виргавирусов, определяющий межштаммовые отличия, очень широк. В частности, вирус TMV заражает 125 видов растений, принадлежащих к девяти семействам. Основной ущерб наносится урожаю табака (до 2% потерь в Северной Америке), огурца, перца и томата; от этого вируса страдают и декоративные растения.

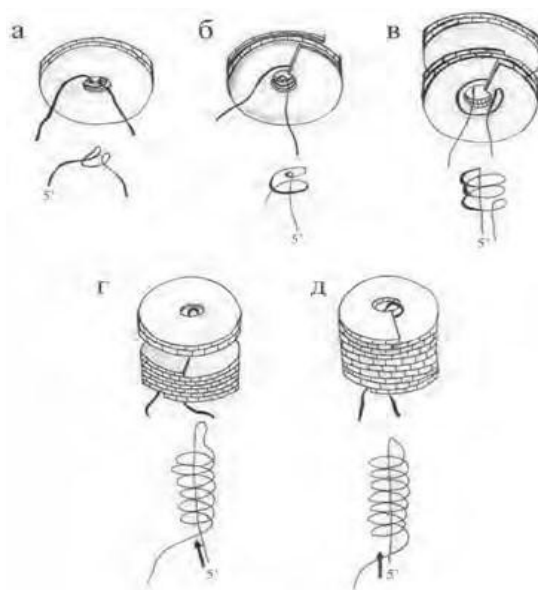
Задание 1. Определите способы рекомбинации у РНК(+)содержащих фитовирусов.



1 — родительские нити ДНК; 2 — рекомбинация; 3 — рекомбинантная нить.
Стрелки — фрагменты, вошедшие в состав рекомбинантной нити.

А _____
Б _____
В _____

Задание 2. Определите и объясните этапы сборки вириона вируса табачной мозаики (TMV), используя лекционный и дополнительный материалы.



- а _____
б _____
в _____
г _____
д _____

Теоретическая часть

Вироиды. Наряду с истинными вирусами растений существуют уникальные вирусоподобные агенты — вироиды, которые автономно репродуцируются в чувствительных растениях-хозяевах, вызывая у них болезни, синдромы которых сходны с синдромами вирусных болезней.

Хотя вироиды не являются вирусами, их по методологическим соображениям причисляют к нетрадиционным объектам вирусологии. Показательно, что в настоящее время их классифицируют согласно правилам Международного кодекса номенклатуры вирусов (ICTV), и вопросы их таксономии относятся к юрисдикции Международного комитета по таксономии вирусов (ICTV). Поэтому включение вироидов в раздел, посвященный вирусам, содержащим ssРНК(+), вполне оправдано.

Биологическая природа вироидов. Сходство вироидов с РНК-содержащими вирусами заключается:

- в ультрамикроскопическом размере (критерий фильтруемости);
- в одном и том же типе носителя генетической информации;
- в инфекционности.

Строение вироидов. В настоящее время на основе различий в строении РНК, а также с учетом использования разных вариантов репликации обособляются два семейства вироидов — *Pospiviroidae* и *Avsunviroidae*. В семействе *Avsunviroidae* меньше видов и они имеют более узкий круг хозяев.

Для первичной структуры РНК представителей семейства *Pospiviroidae* характерна высокая степень автокомплементарности, благодаря чему ~70% нуклеотидов спарены друг с другом Уотсон-Криковыми связями. В результате этого кольцевая ssРНК приобретает линейную ds-форму. Точнее сказать, она выглядит как неразветвленная палочка, в которой имеется несколько «пузырьков» или шпилек, а также две короткие (размером в несколько нуклеотидов) ss-петли на концах преимущественно линейной dsРНК.

У типового вида семейства *Pospiviroidae*, вириода веретеновидности клубней картофеля (PSTVd; 359 н.), и родственных ему вириодов в центральном высококонсервативном домене (англ. **central conservative region**, CCR) расположены два ss-«пузырька» с плечами длиной 4–5 н., между которыми находится ds-участок размером 8 н. Центральный домен фланкирован доменом патогенности (англ. **pathogenic**, P) и варибельным доменом (англ. **variable**, V). По концам расположены левый терминальный (англ. **terminal left**, TL) и правый терминальный (англ. **terminal right**, TR) домены.

Для первичной структуры РНК у представителей семейства *Avsunviroidae* (типовой вид — *Avocado sunblotch viroid* (ASBVd) характерна меньшая степень самокомплементарности, из-за чего кольцевая ssРНК приобретает форму палочки только на одном конце молекулы. В данном случае CCR-домен отсутствует; зато на другом конце находится система протяженных шпилек; кроме того, в молекуле РНК имеется консервативная последовательность рибозима.

Фитовирусы с геномной ssРНК(–). Такой тип генома имеется у представителей только двух семейств (*Bunyaviridae* и *Phabdiviridae*), к которым, наряду с фитовирусами, относятся вирусы беспозвоночных и позвоночных. Хотя фитовирусы составляют относительно малую часть этой группы, их значение исключительно велико, поскольку они наносят огромный вред сельскому хозяйству и при благоприятном для себя сочетании абиотических и биотических факторов (в частности, при высокой численности переносчиков) способны уничтожить почти весь урожай чувствительных к ним культур. Особенно страдают от них посевы зерновых.

Антисмысловой РНК-геном не инфекционен, поскольку в хозяйских клетках отсутствуют полимеразы, связывающиеся с РНК(–). Поэтому в данном случае вирион должен обязательно содержать несколько копий вирусной РНК-зависимой РНКполимеразы.

Семейство *Bunyaviridae*. Первый буньявирус был выделен в 1940 г. при эпидемии в поселении Буньямвера (англ. Bunyamwera; Уганда, Центральная Африка). Однако это семейство было охарактеризовано и получило свое нынешнее название только в 1975 г.

Структура семейства. В семейство *Bunyaviridae* входят четыре рода вирусов животных (*Hantavirus*, *Nairovirus*, *Orthobunyavirus* и *Phlebovirus*) и лишь один род фитовирусов — *Tospovirus*.

Строение вириона. Сферические оболочные вирионы тосповирусов имеют диаметр ~90 нм; на их поверхности расположены гликопротеиновые пепломеры. Внутри оболочки находятся три (по числу сегментов генома) спиральных нуклеокапсида длиной 200–300 нм и диаметром 2–2,5 нм; каждый из них ассоциирован с копией РНК-полимеразы L.

Семейство *Rhabdoviridae*. Данное семейство вирусов с палочковидными вирионами (греч. *rhabdos* — палка) насчитывает свыше 150 видов, которые инфицируют беспозвоночных и позвоночных животных, а также растения. Они вызывают ряд тяжелых заболеваний человека и домашних животных и болезни зерновых культур.

Фитовирусы с геномной dsднк, имеющие стадию обратной транскрипции.

Семейство *Caulimoviridae*. Фитовирусы, содержащие dsДНК, были впервые описаны в 1968 г., однако только в 1983 г. было установлено, что их размножение связано с обратной транскрипцией на основе использования репликативного РНК-интермедиата.

В отличие от сборной группы ретровирусов животных, данную группу фитовирусов называют «параретровирусами» (греч. *para* — многозначная приставка; в данном случае — ложные ретровирусы), поскольку их геном не кодирует интегразу, которая могла бы обеспечить встраивание вирусного генома в геном хозяйской клетки и, как следствие, лизогенизацию.

Представители семейства *Caulimoviridae* различаются между собой по строению генома, в частности по нуклеотидным последовательностям ДНК-полимеразы и РНК-полимеразы, а также по архитектуре вирионов.

Наиболее изученным представителем рассматриваемого семейства является вирус мозаики цветной капусты (*Cauliflower mosaic virus*, CaMV); его урожай составляет до 100 частиц на инфицированную клетку, и после размножения он распространяется по всему растению.

Транскрипция. После попадания вируса в клетку геномная dsДНК раздевается и транспортируется в ядро, где с помощью хозяйской экзонуклеазы и лигазы в первую очередь устраняются нарушения непрерывности.

Полученный репликативный интермедиат связывается с ядерными гистонами, образуя мини-хромосому; хозяйская ДНК-зависимая РНК-полимераза синтезирует с соответствующих промоторов две мРНК — 35S мРНК и 19S мРНК, которые транспортируются в цитоплазму.

Промотор 35S является очень активным конститутивным промотором (он используется в генетических конструкциях с целью экспрессии чужеродных генов у многих видов двудольных растений). Транскрипция с этого промотора осуществляется во всех ORF; образующаяся полицистронная мРНК имеет концевую избыточность (ее размер на 180 н. превышает размер вирусного генома).

Моноцистронная 19S мРНК кодирует фактор транскрипции VI.

Репликация. Копирование генома параретровирусов осуществляется через РНК-интермедиат, или прегеномную РНК.

Прегеномная РНК, которая образуется в результате транскрипции с промотора 35S и содержит на обоих концах прямые повторы, служит матрицей для обратной транскрипции; она же используется в качестве мРНК для синтеза всех белков вируса CaMV.

Процесс обратной транскрипции протекает так же, как у ретровируса HIV-1. Для инициации синтеза минус-нити ДНК используется затравка (тРНК^{Met} клетки-хозяина), которая связывается со специфическим сайтом, расположенным на расстоянии ~600 н. от 5'-конца прегеномной РНК.

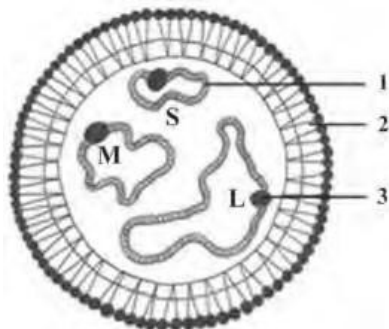
Дальнейшие этапы обратной транскрипции протекают в целом так же, как у ретровируса HIV-1, — полноразмерная нить комплементарной ДНК (кДНК) синтезируется в три этапа, с использованием трех разных матриц.

Борьба с фитовирусной инфекцией. Необходимость борьбы с фитовирусами продиктована колоссальным ущербом, который они наносят мировому сельскому хозяйству. Применяемые меры подразделяются на профилактические и терапевтические. Наряду с этим производится выбраковка зараженных, но еще живых растений, что иногда практикуется в случае животных, но, естественно, недопустимо по отношению к человеку.

Ограничение распространения вируса. Основной превентивной мерой борьбы с эпифитотиями служит контроль за интродукцией растительных культур (в том числе декоративных), а также размещение питомников вдали от мест хозяйственного выращивания растений. **Ограничение распространения переносчиков.** В последнее время большое внимание уделяется рациональному конструированию агроландшафтов, где численность переносчиков фитовирусов поддерживается на низком уровне естественным путем. **Получение неинфицированного посадочного материала.** В соответствующий комплекс мер входят: 1) отбор исходного материала без симптомов болезни; 2) использование культуры клеток апикальной меристемы; 3) обеззараживание методом термотерапии; 4) выращивание в питомниках в условиях защиты от заражения; 5) контроль в процессе выращивания. **Диагностика инфекций.** К ранним мерам диагностики относится выявление фитовирусов с помощью молекулярно-биологических и серологических тестов; поздняя диагностика проводится путем мониторинга посевов на предмет выявления и уничтожения поврежденных растений. **Химиотерапия.** Примером химиотерапевтического лечения от фитовирусной инфекции служит обработка зараженных клубней такими препаратами, как рибавирин или 5-азадигидроурацил-2,4-диоксидигидро-1,3,5-триазин (DHT). **Селекция вирусоустойчивых сортов.** Наряду с

традиционной селекцией используется создание методами генной инженерии вирусоустойчивых сортов и разновидностей.

Задания 1. Соотнесите структурные элементы вириона тосповируса.



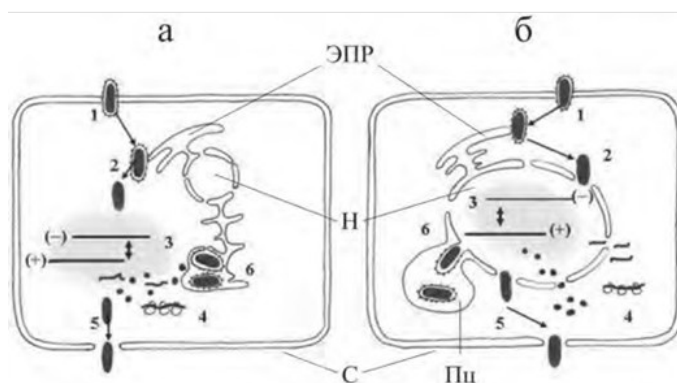
M, L и S. _____

1. _____

2. _____

3. _____

Задания 2. Объясните этапы цикла репродукции фитовирусов.



а – род *Cytorhabdovirus*

б – род *Nucleorhabdovirus*

ЭПР – эндоплазматический ретикулум; Н – нуклеоплазма; С – клеточная стенка; Пц – перинуклеарная цистерна.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №13 (1).

ВИРУСЫ ЖИВОТНЫХ. ОБЩИЕ СВОЙСТВА ВИРУСОВ ЖИВОТНЫХ. ОНТОГЕНЕЗ ВИРУСОВ ЖИВОТНЫХ. СПЕЦИФИЧНОСТЬ ВИРУСОВ ЖИВОТНЫХ. СИСТЕМАТИКА ВИРУСОВ ЖИВОТНЫХ. МЕТОДЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ВИРУСОВ ЖИВОТНЫХ. ТИПЫ ИНФЕКЦИЙ, ВЫЗЫВАЕМЫХ ВИРУСАМИ ЖИВОТНЫХ. МЕТОДЫ НАБЛЮДЕНИЯ И ИЗУЧЕНИЯ СТРОЕНИЯ ВИРУСОВ ЖИВОТНЫХ.

Цель работы: исследовать свойства вирусов животных, их онтогенез, специфичность, типы вызываемых инфекций и принципы систематики. Получить представление о методах культивирования и наблюдения за вирусами животных.

Ход работы:

Теоретическая часть

Общие свойства вирусов животных. Специфика вирусов животных тесно связана с особенностями строения и физиологии их хозяев, поскольку является результатом их совместной эволюции.

Эти вирусы проникают в клетки либо путем эндоцитоза, либо в результате слияния оболочки вириона с цитоплазматической мембраной. Вирус гриппа, например, использует

механизм клатрин-опосредованного, а полиомавирусы — кавеолин-опосредованного эндоцитоза. В свою очередь, вирусы герпеса, вирус иммунодефицита человека и вирус кори доставляют свой генетический материал в цитоплазму хозяина путем слияния липопротеиновой мембраны вириона с цитоплазматической мембраной. Таким образом, в отличие от бактериофагов, вирусы животных проникают в клетку либо в интактном виде, либо частично раздетыми.

Онтогенез вирусов животных. Адсорбция. Для того, чтобы вирус прикрепился к клетке, на ее поверхности должны присутствовать рецепторы с той или иной степенью избирательности; соответственно различают неспецифическую и специфическую адсорбцию. **Проникновение вируса.** Как уже отмечалось, вирусы животных проникают в клетки либо путем эндоцитоза, либо в результате слияния суперкапсида с цитоплазматической мембраной. **Раздевание вируса и презентация генома.** У вирусов животных, использующих для проникновения в клетки механизм слияния мембран, презентация генома обычно сопряжена с проникновением. Если вирус заражает клетку путем эндоцитоза, проникновение предшествует презентации генома.

Синтез вирусных белков и нуклеиновых кислот. Различают ранние и поздние вирусные белки; первые образуются в начале цикла размножения, вторые — в конце его. Многие вирусы животных на ранней стадии инфекции синтезируют специализированные белки, подавляющие иммунный ответ хозяина. Как правило, это неструктурные белки, которые не входят в состав вирусных частиц. **Сборка вирионов.** После того, как в клетке накопилось достаточно вирусных структурных белков, начинается сборка вирионов. У большинства ДНК-содержащих вирусов животных сначала формируются капсиды, а затем в них упаковывается генетический материал. Вирионы оболочных РНК-содержащих вирусов упаковываются и при отпочковании от клеточных мембран. **Выход вирионов.** Безоболочные вирусы животных часто образуют внутри инфицированной клетки обширные квазикристаллические скопления. В данном случае вирионы могут выйти из клетки только после того, как цитоплазматическая мембрана разрушится и клетка погибнет. Некоторые вирусы, например, аденовирусы, помогают выходу своего потомства, образуя **белки смерти**, или **апоптотины** (англ. death protein, DP; apoptin), которые стимулируют апоптоз. **Внеклеточное созревание вирионов.** Для многих вирусов животных характерна стадия внеклеточного созревания (англ. maturation), когда вышедшие из клетки частицы вирусного потомства претерпевают изменения под воздействием вирусных и/или клеточных ферментов. Вновь синтезированные вирусные частицы зачастую не способны осуществить следующий раунд размножения, пока не созреют.

Специфичность вирусов животных. Вирусы способны размножаться в клетках животных определенного вида и передаваться от одной особи к другой. Как правило, вирусы животных могут размножаться в клетках одного или нескольких родственных видов хозяина.

Специфичность вируса (англ. host specificity — специфичность в отношении хозяина) непосредственно не связана со способностью вызывать заболевание — многие вирусы циркулируют в природных популяциях хозяев, не причиняя им особого вреда. В то же время у «тупикового» хозяина, каковым часто является человек, вирусы животных способны вызывать тяжелые, а иногда смертельные заболевания (в популяции тупикового хозяина вирус по определению не передается от особи к особи). Примерами служат вирусы бешенства и клещевого энцефалита.

Для многих вирусов животных характерен сложный экологический цикл, обусловленный свойством размножаться в клетках неродственных организмов, например, млекопитающих и членистоногих. Очень часто промежуточными хозяевами служат членистоногие (клещи, москиты и т. д.), поэтому вирусы, которые передаются млекопитающим через их укус, называются **арбовирусами** (сокр. от англ. arthropod borne virus — вирус, переносимый членистоногими).

Следует учесть, что специфичность вирусов никогда не бывает абсолютной и варьирует в широких пределах в зависимости от природы вируса и хозяина. Например, чума плотоядных, поражающая главным образом собак и волков, не раз становилась причиной гибели львов и леопардов в африканских национальных парках.

Систематика вирусов животных. Современная систематика вирусов в первую очередь учитывает тип геномной нуклеиновой кислоты и, как следствие, стратегию ее транскрипции и репликации. Согласно классификации Дэвида Балтимора, можно выделить семь основных групп вирусов животных:

- ssPHK(+)-вирусы семейств Caliciviridae, Coronaviridae, Flaviviridae, Picorna viridae и Togaviridae;
- ssPHK(–)-вирусы семейств Bunyaviridae, Filoviridae, Orthomyxoviridae, Paramyxoviridae и Rhabdoviridae;
- dsPHK-вирусы семейств Birnaviridae и Reoviridae;
- ssДНК-вирусы семейств Circoviridae и Parvoviridae;
- dsДНК-вирусы семейств Adenoviridae, Asfarviridae, Herpesviridae, Iridoviridae и Papillomaviridae;
- ssPHK-ретровирусы семейства Retroviridae; — dsДНК-ретровирусы семейства Hepadnaviridae.

Методы культивирования вирусов животных. Современные методы культивирования вирусов животных можно условно подразделить на те, когда используются лабораторные животные, и те, когда используются клеточные культуры. *Лабораторные животные как система для выделения и культивирования вирусов.* На заре вирусологии после первичного выделения вирусов от больных людей инфекционный материал размножали на лабораторных животных, причем для изучения вспышек неизвестных заболеваний вирусологам иногда требовался целый «зоопарк».

К вирусному заражению обычно наиболее чувствительны новорожденные животные. Поэтому в вирусологической практике чаще всего используют детенышей мелких грызунов (крыс, мышей и хомяков), а также птенцов, хотя в некоторых случаях ветеринарные вирусологи предпочитают более крупных животных — коров, овец и свиней.

Клеточные культуры очень широко применяются в вирусологии для выделения вирусов от больных, для накопления вирусного материала с целью производства вакцин, для изучения онтогенеза вирусов, для тестирования противовирусных препаратов и т. д. Однако следует иметь в виду, что условия размножения вируса *in vitro* иные, чем в организме животного. Главное различие, как уже отмечалось, состоит в том, что в клеточной культуре вирус не подвержен воздействию со стороны иммунной системы хозяина и поэтому часто теряет гены, отвечающие за подавление иммунного ответа.

В общем случае различают первичные и перевиваемые клеточные культуры.

Типы инфекций, вызываемых вирусами животных. *Типы инфекций на уровне клеток.* По характеру взаимодействия вируса с клетками инфекции подразделяются на литические, хронические и латентные. При размножении вирусов в клеточных культурах конкретный характер инфекции проявляется в том или ином ЦПД; особым типом инфекции, характерным для вирусов животных, является злокачественная трансформация клеток, что также наблюдается в культуре.

Типы инфекции на уровне организма. При классификации типов взаимодействия вирусов животных и организма учитываются такие явления, как клинические признаки инфекции и реакция на нее иммунной системы. В этом случае различают следующие виды вирусной инфекции: острую, хроническую, латентную и медленную. Три последних вида инфекции объединяются понятием «персистентная инфекция». Она характеризуется продолжительным, часто пожизненным существованием вируса в хозяине. В зависимости от физиологического состояния последнего она может время от времени активизироваться или ослабляться.

Методы наблюдения и изучения строения вирусов животных. В настоящее время основным методом визуального наблюдения вирусных частиц и изучения их строения служит *просвечивающая электронная микроскопия* (англ. transmissive electron microscopy, TEM), используемая в разных модификациях.

Метод *негативного контрастирования* (англ. negative staining) применяют для изучения формы вирусных частиц. С этой целью их осаждают на полимерной подложке (ее наносят на поддерживающую металлическую сеточку), а затем обрабатывают раствором вещества-контрастера, обволакивающего частицы и проникающего в неровности их поверхности. Излишек контрастера удаляется фильтровальной бумагой; препарат высушивают на воздухе и помещают в держатель электронного микроскопа.

Ультратонкие срезы (англ. ultrathin section) инфицированных клеток служат для изучения внутреннего строения вириона и морфологических особенностей отдельных этапов размножения вируса.

В настоящее время проблемы, связанные с низким контрастом биологических объектов, отчасти удается преодолеть с помощью *низковольтной просвечивающей электронной микроскопии* (англ. low-voltage TEM). Разрешение лучших приборов этого типа, свободно помещающихся на письменном столе, составляет около 2 нм, что вполне достаточно для морфологической идентификации большинства вирусов.

В качестве альтернативы просвечивающей электронной микроскопии недавно разработан метод *криоэлектронной микроскопии* (англ. cryo-electron microscopy), позволяющий получать изображения неокрашенных вирусных частиц в их естественном гидратированном состоянии.

В начале 1990-х годов был разработан метод *криоэлектронной 3D-реконструкции* симметричных вирусов, основанный на компьютерном суммировании изображений отдельных частиц (англ. single particle analysis). Так были получены изображения аденовирусов, ротавирусов и капсидов вируса герпеса; разрешение составляло 3–4 Å.

Детали строения несимметричных, в частности оболочных, вирусов можно изучать с помощью метода *криоэлектронной томографии* (англ. cryo-electron tomography), разработанного в начале 2000-х годов. Он позволяет получить 3D-изображение произвольно выбранной вирусной частицы, отражающее структуру ее поверхности и ее внутреннее устройство.

Ценную информацию о морфогенезе вирионов можно получить при помощи *сканирующей электронной микроскопии* (англ. scanning electron microscopy, SEM).

Одна из современных модификаций SEM, *экологическая сканирующая электронная микроскопия* (англ. environmental scanning electron microscopy, ESEM), позволяет исследовать образцы во влажной камере без предварительного напыления металлом.

Задания 1. Ознакомьтесь с методами, используемыми для культивирования вирусов животных в культуре клеток и наблюдайте за ростом и распространением вирусов животных в культуре клеток.

Материалы: Аппарат для культивирования клеток, среда для культивирования клеток, образцы вирусов животных, чашки для культивирования клеток, стерильные пипетки и наконечники, инкубатор.

Ход работы:

- 1) Подготовьте среды для культивирования клеток в соответствии с инструкциями производителя;
- 2) Поместите клетки в чашки для культивирования клеток и инкубируйте в течение ночи.
- 3) Удалите носитель из чашки для культивирования клеток и добавьте раствор животного вируса.
- 4) Инкубируйте чашки с клеточной культурой в течение соответствующего периода времени, в зависимости от культивируемого вируса.

- 5) Наблюдайте за клетками для опознавания любых признаков цитопатических эффектов, таких как округление, агрегация или лизис.
- 6) Запишите свои наблюдения и при необходимости сделайте фотографии.
- 7) Повторите шаги 3-6 для разных вирусов или разных типов клеток, чтобы сравнить результаты.

Примечание. Это основная лабораторная задача, которую следует выполнять под наблюдением руководителя лаборатории или опытного исследователя. При работе с вирусами животных следует соблюдать меры безопасности, такие как ношение перчаток и работа в боксе биологической безопасности.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №13 (2). БИОРАЗНООБРАЗИЕ ВИРУСОВ ЖИВОТНЫХ.

Цель работы: рассмотреть разнообразие вирусов животных и изучить характеристики и свойства вирусов, содержащих геномную dsДНК. исследование различных семейств вирусов животных, которые содержат в качестве генетического материала либо одноцепочечную ssДНК, либо двухцепочечную dsSPHK.

Ход работы:

Теоретическая часть

Вирусы животных, содержащие геномную dsДНК. Изучение вирусов животных позволяет не только проникнуть в тайны их молекулярных взаимоотношений с организмом хозяина, но и решить конкретные задачи медицины. В настоящем разделе мы будем придерживаться традиционной направленности вирусологии и в первую очередь уделим внимание вирусным заболеваниям человека, которые вызывают представители семейств *Adenoviridae*, *Herpesviridae*, *Papillomaviridae* и *Poxviridae*.

Семейство *Adenoviridae*. В 1953 г. из аденоидов (носоглоточных миндалин) людей, страдающих респираторными заболеваниями, были выделены ранее неизвестные вирусы, которые вскоре получили название аденовирусов (от греч. aden — железа).

В настоящее время в семействе *Adenoviridae* описаны многочисленные вирусы млекопитающих, птиц, рептилий, земноводных и рыб; только у человека известно свыше 50 аденовирусов.

Вирионы аденовирусов — это икосаэдры диаметром 70–90 нм с нитями (фибриллами) на вершинах. Их генетический материал — линейная молекула dsДНК размером 26–45 тыс. п.н.

Структура семейства. В семейство *Adenoviridae* входят два рода, обособленные на основе генетических критериев (*Atadenovirus* и *Siadenovirus*), а также три рода, в которые объединены аденовирусы в соответствии с типом хозяина (*Aviadenovirus*, *Ichtadenovirus* и *Mastadenovirus*).

Строение вириона. Частицы аденовирусов представляют собой икосаэдр, вершины которого несут нити с концевыми утолщениями. Диаметр вириона составляет 70–80 нм (без учета длины нитей). На негативно контрастированных препаратах видны относительно крупные капсомеры. На вершинах икосаэдра находятся пентоны, к которым прикрепляются нити. Ребра и грани икосаэдра образованы гексонами, составляющими ~80% массы вириона.

Аденовирусные инфекции человека и животных. Клинические проявления аденовирусных инфекций человека в первую очередь связаны с такими респираторными заболеваниями, как тонзиллиты и ангины. Аденовирусы часто становятся причиной вспышек ОРЗ в незадолго до этого сформированных замкнутых коллективах, например в детских садах или армейских подразделениях; у детей ОРЗ обычно вызывают аденовирусы типов-1, -2, -3, -5 и -6; у взрослых типа-4 и типа-7. Особенно тяжело заболевание может протекать при сочетанной инфекции разными респираторными вирусами.

Семейство *Herpesviridae*. У вирионов герпесвирусов сложное строение — икосаэдрический капсид покрыт липопротеиновой оболочкой. Эти вирусы содержат геномную линейную dsДНК (120–300 тыс. п.н.), реплицируются в ядре клетки и способны к персистенции.

Систематика герпесвирусов. В названии семейства (греч. herpeton — пресмыкающееся; в данном случае — ползучий, крадущийся) отражена двойственная способность герпесвирусов человека: сохраняться в латентной форме с периодической активацией и ремиссией, а также вызывать характерное клиническое проявление в виде центробежно расходящихся кожных высыпаний. Общими свойствами, в частности, обладает вирус-1 простого герпеса (*Human herpesvirus 1*, HHV-1; род *Simplexvirus*), знакомый многим из нас по болезненным волдырям, появляющимся на губах, а также в области рта и носдрей после перенесенного стресса, простудного заболевания или иного вмешательства в нормальный иммунный статус.

Еще недавно всех известных герпесвирусов человека объединяли в семейство *Herpesviridae*, однако открытие аналогичных вирусов у других животных, в том числе амфибий, моллюсков и рыб, потребовало изменить эту классификацию. В результате появился новый порядок *Herpesvirales*, к которому кроме *Herpesviridae* относятся семейства *Alloherpesviridae* и *Malacoherpesviridae*, а также ряд родов вне семейства.

Семейство *Papillomaviridae*. В семейство *Papillomaviridae* помещены вирусы с геномной кольцевой dsДНК. Их сравнительно небольшие геномы (~8 тыс. п.н.) кодируют несколько структурных и регуляторных белков; транскрипция и репликация осуществляются с помощью ферментов хозяина.

Папилломавирусы реплицируются в клеточном ядре; сборка вирионов происходит в нуклеоплазме. Цикл размножения протекает по литическому или лизогенному сценарию; возможен вариант псевдолизогении (когда вирусная ДНК присутствует в нуклеоплазме в виде кольцевой episомы, или мини-хромосомы).

Папилломавирусы обладают ярко выраженным тканевым тропизмом и заражают клетки базального слоя эпителия. Инфекция протекает либо бессимптомно (тогда ее можно рассматривать как персистентную), либо с периодическими обострениями. Во втором случае в инфицированной зоне появляются характерные доброкачественные новообразования — бородавки и папилломы; название семейства является аббревиатурой этих симптомов (лат. papilla — сосочек и греч. oma — опухоль). Локальная трансформация эпителия наблюдается на коже и в области верхних дыхательных путей, реже — на конъюнктиве, в ротовой полости, пищеводе и прямой кишке.

Безобидные, на первый взгляд, папилломавирусы привлекли к себе внимание в 1933 г., когда американский вирусолог Ричард Шоуп (R. E. Shope) доказал, что они могут вызывать рак кожи у кроликов. Немецкий вирусолог Харальд цур Хаузен (H. zur Hausen), открывший первого онкогенного папилломавируса (*Human papillomavirus*, HPV), стал одним из лауреатов Нобелевской премии 2008 г. по физиологии и медицине.

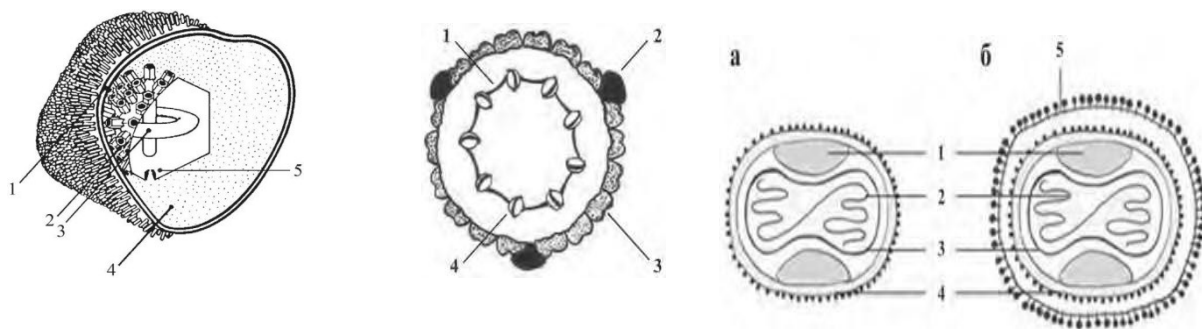
Семейство *Poxviridae*. По ряду признаков поксвирусы отличаются от остальных ДНК-содержащих вирусов:

- геном кодирует ферменты репликации ДНК;
- ферменты первичной транскрипции упаковываются в вирион;
- цикл размножения происходит в цитоплазме;
- образуется два типа инфекционных частиц;
- выход из хозяйской клетки осуществляется разным способом; заболевания человека имеют характерную симптоматику.

По величине частиц, а также по размеру генома они относятся к «гигантским» вирусам.

Поксвирусы вызывают у высших животных оспу и оспоподобные заболевания.

Задание 1. Определите структурные элементы вириона герпесвируса в разрезе, вириона папилломавируса и инфекционных частиц поксвирусов.



A.

1. _____
2. _____
3. _____
4. _____
5. _____

Б.

1. _____
2. _____
3. _____
4. _____

В.

а - внутриклеточные зрелые частицы (IMV); б - внеклеточные оболочные частицы (EEV).

1. _____
2. _____
3. _____
4. _____
5. _____

Теоретическая часть

Вирусы животных, содержащие геномную ssДНК. К этой группе относится семейство *Circoviridae* (первоначально в нем было два рода; позднее к ним добавился род *Anellovirus*, который недавно был обособлен в семейство *Anelloviridae*) и семейство *Parvoviridae*.

Для экспрессии генов этих вирусов необходимо, чтобы транскрипции предшествовал синтез второй нити ДНК.

Вирусы семейств *Circoviridae*, *Anelloviridae* и *Parvoviridae* имеют большое эпидемиологическое значение. Цирковирсы и парвовирусы являются возбудителями болезней человека и хозяйственно-важных животных. В свою очередь, у людей в последнее время стали все чаще регистрироваться анелловиральные инфекции.

Семейство *Circoviridae*. Представители семейства *Circoviridae* примечательны тем, что их геномы имеют минимальный размер среди геномов автономно размножающихся (т. е. без участия хелперов) вирусов ядерных организмов. Образное название этого семейства объясняется кольцевой формой геномной ssДНК (лат. *circulus* — круг лый).

В семействе *Circoviridae* два рода — *Circovirus* и *Gyrovirus*. К роду *Circovirus* принадлежат цирковирсы копытных; наиболее опасны возбудители системного

заболевания поросят, при котором поражаются пищеварительная и дыхательная системы, и животное погибает от истощения. Спектр хозяев рода *Gyrovirus* включает в себя несколько семейств диких и домашних птиц. Наиболее изучен вирус анемии кур, которая особо опасна для цыплят на протяжении десяти дней с момента вылупления.

Семейство *Parvoviridae*. Парвовирусы — одни из самых мелких (лат. *parvus* — маленький). В то же время их частицы являются одними из самых стабильных: они устойчивы к воздействию кислот, щелочей и других агрессивных химических реагентов, а также к нагреванию до 50°C.

Структура семейства. Эти вирусы подразделяют на два подсемейства, одно из которых (*Parvovirinae*), содержащее пять родов, ассоциировано с млекопитающими, а второе (*Densovirinae*), в котором четыре рода, — с насекомыми.

Строение вириона. Безоболочные икосаэдрические частицы парвовирусов имеют размер 18–26 нм и состоят из 60 капсомеров, которые, в свою очередь, образованы одним-трем протомерами.

Строение генома и репликация геномной ДНК. В капсид парвовируса упакована ssДНК размером 4–6 тыс. н. (соотношение числа вирионов с плюс- и минус-нитями примерно равное). На концах молекулы находятся длинные (150–250 н.) инвертированные концевые повторы (англ. *inverted terminal repeat*, ITR), которые содержат несколько палиндромных участков и образуют Т-образные шпильки, необходимые для репликации геномной ДНК.

Вирусы животных, содержащие геномную dsРНК. Вирусы, содержащие dsРНК, имеют ряд общих признаков:

- сегментированный геном;
- безоболочный вирион, который содержит РНК-зависимую РНК-полимеразу;
- неполное раздевание вируса;
- образование потомства вирионов в цитоплазме.

Семейство *Birnaviridae*. Геном бирнавирусов состоит из двух сегментов dsРНК, что отражено в названии семейства (англ. **bi-segmented RNA**).

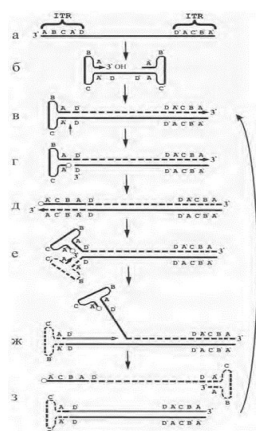
Важнейшими представителями бирнавирусов являются вирус инфекционного бур сита кур (*Infectious bursal disease virus*, IBDV) и вирус инфекционного некроза поджелудочной железы рыб (*Infectious pancreatic necrosis virus*, IPNV). Оба они известны с начала 1960-х годов как экономически актуальные патогены, наносящие значительный урон птицефабрикам и рыбоводческим хозяйствам. Аналоги этих бирнавирусов найдены у двусторчатых моллюсков и насекомых; у млекопитающих они не обнаружены.

Не все вирусы животных с геномом из двух сегментов dsРНК относятся к семейству *Birnaviridae*. Из кишечника млекопитающих, в том числе человека, недавно выделены мелкие икосаэдрические вирусы диаметром ~40 нм, содержащие два сегмента dsРНК общим размером ~4 тыс. п.н. (2,5 тыс. п.н. + 1,5 тыс. п.н.). Предполагается объединить их в новое семейство *Picobirnaviridae* («мелкие» бирнавирусы). Поскольку в отличие от бирнавирусов пикобирнавирусы не размножаются в клеточной культуре, есть вероятность того, что они поражают не самих млекопитающих, а микрофлору их кишечника.

Семейство *Reoviridae*. Конкретизирующая часть «*Reo*» в названии данного семейства происходит от начальных букв английского словосочетания *respiratory/enteric/orphan*. Дело в том, что в 1960-е годы была описана группа морфологически сходных вирусов, некоторых из которых выделяли от больных с респираторной (англ. *respiratory virus*) или кишечной симптоматикой (англ. *enteric virus*); однако большинство из них не ассоциировались с каким-либо заболеванием (англ. *orphan virus* — «вирус-сирота»). Впоследствии многие из них были идентифицированы как этиологические агенты тех или иных болезней, однако первоначальное название семейства сохранилось.

Безоболоччные вирионы реовирусов имеют диаметр 60–95 нм и содержат 9–12 сегментов генома, размер которого лежит в пределах от 15 до 28 тыс. п.н.

Задания 2. Зарисуйте и объясните механизм репликации генома парвовируса, используя лекционный и дополнительный материал.



Задания 3. Выделите и охарактеризуйте ssДНК и dsРНК-вирусы в образцах клеток животных.

Материалы: Образцы клеток животных (например, кровь, ткани и мазки), набор для выделения РНК/ДНК, набор для ОТ-ПЦР (для РНК-вирусов), набор для ПЦР (на ДНК-вирусы), праймеры, специфичные для семейств *Circoviridae*, *Anelloviridae*, *Parvovirus*, *Birnaviridae* и *Reoviridae*, аппарат для гель-электрофореза, Бромистый этидий, УФ трансиллюминатор, микроцентрифуга, пипетки, стерильные пробирки, автоклав.

Ход работы:

1) Экстракция РНК и ДНК: - Соберите образцы клеток животных и храните их при температуре -80°C .

- Используйте набор для выделения РНК/ДНК для выделения и очистки РНК и ДНК из образцов клеток животных.

2) Амплификация ОТ-ПЦР (для РНК-вирусов): - Подготовьте реакционную смесь для каждого набора праймеров, характерного для РНК-вирусов.

- Используйте набор RT-PCR для обратной транскрипции РНК и амплификации ДНК из образцов клеток животных.

- Используйте гель-электрофорез для визуализации амплифицированных продуктов.

3) ПЦР-амплификация (для ДНК-вирусов): - Подготовьте реакционную смесь для каждого набора праймеров, характерного для ДНК-вирусов.

- Используйте набор для ПЦР для амплификации ДНК из образцов животных.

- Используйте гель-электрофорез для визуализации амплифицированных продуктов.

4) Выявление ssДНК и dsРНК-вирусов: - Сравните размеры амплифицированных продуктов с ожидаемыми размерами для семейств *Circoviridae*, *Anelloviridae*, *Parvovirus*, *Birnaviridae* и *Reoviridae*.

5) Интерпретируйте результаты и определите наличие РНК- и ДНК-вирусов в образцах клеток животных.

Примечания: Наденьте перчатки и соблюдайте протоколы безопасности лаборатории. Храните образцы и реагенты при рекомендованных температурах. Подготовьте свежие реагенты для каждого эксперимента. Процедура может быть изменена и усовершенствована в зависимости от конкретных лабораторных требований и целей исследования.

ВИРУСЫ ЧЕЛОВЕКА. ВСПЫШКИ НОВЫХ ДЛЯ ЧЕЛОВЕКА ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

Цель работы: изучить механизмы emergence (возникновения) новых вирусных инфекций человека, проанализировать эпидемиологические параметры недавних вспышек и оценить факторы риска, способствующие зоонозному переносу и последующей адаптации вирусов к человеку.

Ход работы:

Теоретическая часть

Вирусы являются самыми распространенными биологическими объектами на Земле. Они существуют миллиарды лет, задолго до появления человека. Для человека вирусы представляют собой уникальную угрозу: будучи неклеточной формой жизни, они способны проникать в клетки хозяина, перепрограммировать их и использовать для собственного размножения.

История человечества неразрывно связана с историей вирусных эпидемий. Однако в последние десятилетия мы наблюдаем тревожную тенденцию: учащение вспышек новых для человека вирусных инфекций. Понимание природы этих вирусов, механизмов их появления и путей распространения критически важно для глобальной безопасности.

1. Природа возникновения новых вирусных инфекций

Большинство «новых» вирусов на самом деле не являются новыми для природы. Они циркулировали в популяциях животных десятилетиями или веками. Появление у человека - это результат эволюционного «перескока».

1.1. Зоонозы: основной источник угрозы

Около **75%** всех новых инфекционных заболеваний человека имеют зоонозное происхождение. Это означает, что возбудитель передается от позвоночных животных к человеку.

Резервуары: Естественными резервуарами для многих опасных вирусов служат летучие мыши (коронавирусы, эбола, марбург), грызуны (хантавирусы, аренавирусы), птицы (грипп) и приматы (ВИЧ).

Промежуточные хозяева: Часто вирусу требуется адаптация. Например, вирус SARS-CoV-1, вероятно, перешел от летучих мышей к циветтам, а затем к человеку. Вирус MERS перешел от летучих мышей к верблюдам, а от них - к людям.

1.2. Механизмы адаптации

Чтобы вирус начал инфицировать человека, должны произойти определенные генетические изменения:

Мутации: Вирусы с РНК-геномом (грипп, коронавирусы, ВИЧ) мутируют очень быстро из-за отсутствия механизмов коррекции ошибок при репликации. Случайная мутация может позволить вирусному белку (например, спайк-белку коронавируса) связываться с рецепторами человеческих клеток (например, ACE2).

Рекомбинация: Если две разные штаммы вируса инфицируют одну клетку, они могут обмениваться участками генома, создавая новый, более опасный гибрид.

Спилловер (Spillover): Момент непосредственной передачи вируса от животного к человеку. Обычно это единичные случаи, но если вирус приобретает способность передаваться от человека к человеку, начинается вспышка.

2. Ключевые примеры вспышек новых инфекций (XX–XXI века)

Рассмотрим наиболее значимые вирусы, появившиеся или получившие широкое распространение в недавней истории.

2.1. ВИЧ (Вирус иммунодефицита человека)

Появление: Начало XX века (Центральная Африка).

Происхождение: Обезьяний вирус SIV (Simian Immunodeficiency Virus), перешедший к человеку, вероятно, при охоте и разделке туш шимпанзе.

Особенность: Долгий инкубационный период, хроническое течение, поражение иммунной системы. Стал первой глобальной пандемией новой эры.

2.2. Вирусы геморрагических лихорадок (Эбола, Марбург)

Вспышки: С 1976 года по настоящее время (преимущественно Африка).

Происхождение: Летучие мыши (крыланы).

Особенность: Высокая летальность (до 90% для некоторых штаммов Эболы), передача через биологические жидкости. Вспышки носят локальный, но драматичный характер.

2.3. Коронавирусы (SARS, MERS, SARS-CoV-2)

Это семейство вирусов стало символом угрозы XXI века.

SARS-CoV-1 (2002 г.): Вспышка атипичной пневмонии в Китае. Летальность ~10%. Был остановлен жестким карантином.

MERS-CoV (2012 г.): Ближневосточный респираторный синдром. Резервуар - верблюды. Высокая летальность (~35%), но низкая заразность между людьми.

SARS-CoV-2 (2019 г.): Вызвал пандемию COVID-19. Отличается высокой контагиозностью, наличием бессимптомных носителей и способностью уклоняться от иммунитета. Показал уязвимость глобализованного мира.

2.4. Вирусы гриппа (Птичий и Свиной грипп)

Механизм: Вирус гриппа А обладает сегментированным геномом, что облегчает реассортацию (перемешивание генов).

Угроза: Штаммы H5N1 (птичий) и H1N1 (свиной) представляют риск пандемии. Птичий грипп обладает высокой летальностью, но пока плохо передается между людьми.

2.5. Арбовирусы (Зика, Денге, Чикунгунья)

Переносчики: Комары родов *Aedes* и *Culex*.

Динамика: Из-за изменения климата ареал обитания комаров расширяется на север. Вирус Зика (вспышка 2015 г.) вызвал тревогу из-за связи с микроцефалией у новорожденных.

2.6. Вирусы Нипах и Хендра

Происхождение: Летучие мыши -> свиньи/лошади -> человек.

Особенность: Высокая летальность, поражение нервной системы и дыхательных путей. Вспышки регистрируются в Юго-Восточной Азии и Австралии.

3. Драйверы появления новых вирусов (Почему сейчас?)

Учащение вспышек не является случайностью. Оно обусловлено комплексом антропогенных факторов:

1. Уничтожение естественных сред обитания: Вырубка лесов и урбанизация заставляют диких животных (и их вирусы) мигрировать ближе к человеческому жилью. Контакт человека с дикой природой становится чаще.

2. Интенсивное животноводство: Фермы, где содержатся тысячи генетически схожих животных, являются идеальными «инкубаторами» для мутации вирусов и их перехода к человеку (пример: свиной грипп).

3. Глобализация и туризм: Вирус, появившийся в отдаленной деревне, может оказаться в мегаполисе на другом континенте менее чем за 24 часа.

4. Изменение климата: Потепление расширяет зоны обитания переносчиков инфекций (комаров, клещей), принося тропические болезни в умеренные широты.

5. Торговля дикими животными: «Мокрые рынки» в Азии и нелегальная торговля экзотическими животными создают условия для смешения вирусов разных видов в тесном контакте с людьми.

4. Последствия вирусных вспышек

4.1. Медицинские

- Высокая смертность и нагрузка на систему здравоохранения.
- Появление долгосрочных последствий (постковидный синдром, осложнения после гриппа).

- Риск для людей с иммунодефицитом и хроническими заболеваниями.

4.2. Экономические

- Колоссальные убытки от локдаунов, закрытия границ и остановки производства.
- Разрыв логистических цепочек.
- Падение ВВП глобальной экономики (пандемия COVID-19 обошлась миру в триллионы долларов).

4.3. Социальные и психологические

- Рост тревожности, депрессии..
- Стигматизация определенных групп или национальностей.

5. Стратегии профилактики и контроля

Борьба с новыми вирусами требует комплексного подхода, известного как концепция «Единое здоровье» (**One Health**). Она признает взаимосвязь между здоровьем людей, животных и экосистем.

5.1. Эпидемиологический надзор

- Мониторинг популяций диких животных на наличие вирусов (проект *Global Virome Project*).
- Системы раннего предупреждения (отслеживание необычных случаев пневмонии или смертности в клиниках).
- Геномный секвенирование: быстрое определение структуры вируса для создания тестов и вакцин.

5.2. Разработка медицинских контрмер

- **Платформенные технологии вакцин:** Технологии мРНК (как у Pfizer/Moderna) позволяют создать вакцину за месяцы, а не годы.
- **Универсальные вакцины:** Научные усилия направлены на создание вакцин, защищающих от всех штаммов гриппа или всех коронавирусов.
- **Противовирусные препараты:** Разработка лекарств широкого спектра действия.

5.3. Санитарные и общественные меры

- Контроль за торговлей дикими животными.
- Улучшение биобезопасности на фермах.
- Гигиена рук, ношение масок в сезон простуд, изоляция больных.
- Международное сотрудничество (ВОЗ, обмен данными между странами).

6. Будущее: Чего ожидать?

Вирусология прогнозирует, что появление новых патогенов будет продолжаться.

- **Вирусы из вечной мерзлоты:** Таяние льдов Арктики может высвободить древние вирусы, к которым у современного человека нет иммунитета (хотя риск этого считается ниже, чем риск зоонозов).
- **Искусственный интеллект:** ИИ начинает использоваться для предсказания мутаций вирусов и моделирования эпидемий.
- **Готовность:** Главный урок пандемии COVID-19 — мир должен находиться в состоянии постоянной готовности (запасы СИЗ, мощности по производству вакцин, планы действий).

Задание 1. На основе литературных данных необходимо выявить причины, по которым именно этот вирус (любой пример вируса) стал угрозой для человека в конкретный период времени.

Задание 2. Решить ситуационные задачи

Задача 1.

В регионе зарегистрирована вспышка неизвестной респираторной инфекции. Секвенирование показало, что вирус является РНК-вирусом с положительной полярностью.

Вопрос: Почему РНК-вирусы с положительной полярностью часто становятся причиной эмерджентных инфекций по сравнению с ДНК-вирусами?

- Они более устойчивы во внешней среде.
- У них отсутствует система коррекции ошибок при репликации (proofreading), что ведет к высокой изменчивости.

- в) Они всегда передаются через воду.
- г) Они не вызывают иммунного ответа.

Задача 2.

Для контроля вспышки вводится карантин.

Вопрос: Какая мера является наиболее эффективной для прерывания цепи передачи респираторного вируса с инкубационным периодом 5 дней и возможностью передачи до появления симптомов?

- а) Лечение антибиотиками всех контактных.
- б) Изоляция только тех, у кого есть явные симптомы.
- в) Тестирование контактных и изоляция выявленных положительных случаев, независимо от симптомов.
- г) Вакцинация переболевших.

Задача 3.

Вирус MERS имеет высокий коэффициент летальности, но не вызвал пандемию, в отличие от SARS-CoV-2.

Вопрос: Какое свойство вируса MERS ограничило его распространение?

- а) Низкая контагиозность (плохая передача от человека к человеку).
- б) Отсутствие рецепторов у человека.
- в) Чувствительность к ультрафиолету.
- г) Быстрая гибель хозяина до момента заражения других.

Вирусы человека и вспышки новых инфекций - это не просто медицинская проблема, это вызов цивилизации. Эволюция вирусов не останавливается, и в гонке вооружений между патогеном и иммунитетом (как индивидуальным, так и общественным) у человечества нет права на ошибку.

Ключ к безопасности лежит не только в разработке новых лекарств, но и в бережном отношении к природе, ответственном потреблении и глобальной солидарности. Понимание того, что здоровье человека неразрывно связано со здоровьем планеты, является фундаментом для предотвращения будущих пандемий.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №14 (2).

ВИРУСЫ ЧЕЛОВЕКА. ВСПЫШКИ НОВЫХ ДЛЯ ЧЕЛОВЕКА ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

Цель работы: Изучить механизмы возникновения новых вирусных инфекций у человека. Освоить методику обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции в реальном времени (ОТ-ПЦР) с использованием набора реагентов «АмплиСенс Cov-Bat-Fl».

Оборудование и реактивы:

Набор реагентов «АмплиСенс Cov-Bat-Fl» (включая смесь для ОТ-ПЦР, праймеры, зонды, ферменты).

Контрольные образцы:

Положительный контроль (РНК-мишени Cov, Bat, Fl).

Отрицательный контроль (вода без РНКаз).

Учебные образцы (№1–№5, имитирующие мазки).

Амплификатор (термоциклер) с детекцией флуоресценции в реальном времени.

Ламинарный бокс (для подготовки проб).

Дозаторы переменного объема и стерильные наконечники с фильтрами.

Центрифуга-вортекс.

Техника безопасности (Биобезопасность)

Образцы: Используются **только** инаktivированные учебные контрольные образцы (имитаторы), предоставленные производителем или подготовленные преподавателем. Работа с нативным клиническим материалом или образцами от животных в учебной лаборатории **запрещена**.

1. **СИЗ:** Халат, перчатки, маска, защитные очки.

2. **Утилизация:** Все наконечники и пробирки после работы утилизируются в контейнеры для биоопасных отходов с последующей автоклавировкой или обработкой дезинфектантом (хлорсодержащим).

Ход работы:

Теоретическая часть

Большинство новых инфекционных заболеваний человека имеют зоонозное происхождение (COVID-19, грипп, Эбола, MERS). Резервуарами многих коронавирусов являются рукокрылые (летучие мыши). Мониторинг циркуляции вирусов в популяциях животных и ранняя диагностика у людей критически важны для предотвращения пандемий. Метод ОТ-ПЦР является «золотым стандартом» для детекции РНК-вирусов.

Зоонозы: Инфекции, передающиеся от животных к человеку. Ключевой риск представляют РНК-вирусы из-за высокой частоты мутаций.

Набор «АмплиСенс Cov-Bat-Fl»: Мультиплексная система для одновременной детекции:

- *Cov*: Консервативные участки генома бетакоронавирусов (маркер подсемейства Sarbecovirus).
- *Bat*: Специфические маркеры, позволяющие дифференцировать вирусы, циркулирующие в популяциях рукокрылых (филогенетический маркер).
- *Fl*: Вирус гриппа А (как контроль ко-циркуляции респираторных вирусов).
- *BK* (*Внутренний контроль*): Контроль экстракции и амплификации.

Принцип метода: Выделение РНК → Обратная транскрипция (синтез кДНК) → Амплификация специфических участков с флуоресцентной детекцией (TaqMan-зонды).

Практическая часть

Этап 1. Подготовка проб (в ламинарном боксе)

1. Промаркировать пробирки для амплификации согласно номерам образцов (1–5), плюс «Позитивный контроль» (ПК) и «Негативный контроль» (НК).

2. Экстракция РНК с помощью «РИБО-преп» (инструкция)

Внимание: Избегать перекрестного загрязнения. Менять наконечники после каждого образца.

Этап 2. Обратная транскрипция с помощью «РЕВЕРТА-L» (ПО ИНСТРУКЦИИ)

Этап 3. Подготовка проб для амплификации с помощью «ПЦР-комплекта» (ПО ИНСТРУКЦИИ)

1. Рассчитать общий объем реакционной смеси на количество проб + 10% запас.

2. В отдельной пробирке смешать компоненты набора согласно инструкции (буфер, dNTP, ферменты, праймер-зондная смесь).

3. Внести по 15 мкл готовой ПЦР-смеси в каждую пробирку с образцом.

4. Внести по 10 мкл проб кДНК, полученных в результате реакции обратной транскрипции РНК из исследуемых и контрольных образцов

Этап 4. Амплификация

1. Поместить пробирки в амплификатор.

2. Запустить программу амплификации (параметры задаются преподавателем или согласно паспорту набора, примерный режим):

- Обратная транскрипция: 45°C, 15 мин.
- Активация полимеразы: 95°C, 2 мин.
- Циклы (45 циклов): 95°C (10 сек) → 60°C (30 сек, сбор флуоресценции).

3. Каналы детекции:

- FAM (Cov)
- HEX/VIC (Bat)
- ROX (Fl)
- CY5 (Внутренний контроль)

Этап 5. Анализ результатов

1. После завершения программы построить графики амплификации.

2. Определить пороговое значение (Ct) для каждого канала.
3. Заполнить таблицу результатов.

Критерии интерпретации:

- **Ct < 35:** Положительный результат (наличие мишени).
- **Ct > 35 или отсутствие кривой:** Отрицательный результат.
- **ВК (Внутренний контроль):** Должен быть положительным во всех пробирках. Если ВК отрицательный в образце — результат недействителен (ингибирование реакции или ошибка экстракции).

Сценарии для обсуждения:

1. **Cov (+), Bat (-):** Вероятная инфекция человека SARS-подобным вирусом.
2. **Cov (+), Bat (+):** Обнаружение вируса, генетически близкого к резервуарному (летучие мыши). Требуется секвенирование для подтверждения.
3. **Fl (+):** Инфекция вирусом гриппа (дифференциальная диагностика).
4. **Все (-):** Образец свободен от данных вирусов.

Контрольные вопросы

1. Почему РНК-вирусы чаще вызывают новые вспышки заболеваний по сравнению с ДНК-вирусами?
2. В чем преимущество использования мультиплексной ПЦР (как в наборе «АмплиСенс Cov-Bat-Fl») перед моно-ПЦР?
3. Почему в лабораторной работе запрещено использование реальных образцов от диких животных?
4. Что означает высокий показатель Ct (например, 38) по сравнению с низким (20)?
5. Какова роль внутреннего контроля (ВК) в диагностике?

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования
«СЕВЕРО-КАВКАЗСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ
к выполнению самостоятельных работ по дисциплине
«Генетика вирусов»

Направление подготовки
Направленность (профиль)

06.03.01 Биология
Генетика, селекция и биоинформатика

Ставрополь, 2026

Вопросы для самостоятельной подготовки.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 1.

ИСТОРИЯ ОТКРЫТИЯ И ИЗУЧЕНИЯ ВИРУСОВ. СРАВНЕНИЕ ВИРУСОВ И БАКТЕРИЙ

1. Вирусология - наука о вирусах.
2. История развития вирусологии.
3. Значение работ Э. Дженнера, Л. Пастера, Д.И. Ивановского и др. для развития вирусологии.
4. Основные периоды развития вирусологии.
5. Гипотезы происхождения вирусов
6. Почему вирусы долгое время не могли быть обнаружены?
7. В чём принципиальное отличие вирусов от других микроорганизмов?
8. Какие технологии позволили перейти от описательной вирусологии к молекулярной?
9. Почему вирусы считаются «пограничной формой жизни»?
10. Как открытие вирусов повлияло на развитие медицины и биотехнологий?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 2.

ВИРИОН. РАЗМЕР И ФОРМА ВИРИОНА. СОСТАВ ВИРИОНА.

1. Вирион. Основные свойства вириона.
2. Безоболочные и оболочные вирусы.
3. Размеры вирионов. Примеры.
4. Основные типы симметрии вирионов.
5. Структурные элементы вириона.
6. Химический состав вирусов.
7. Типы вирусных ДНК и РНК.
8. Структурные и неструктурные вирусные белки.
9. Липиды и углеводы вирусов.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 3.

ВИРУСНЫЙ ГЕНОМ. ОНТОГЕНЕЗ ВИРУСОВ. ПРИКРЕПЛЕНИЕ ВИРИОНА К КЛЕТКЕ-ХОЗЯИНУ, ИЛИ АДСОРБЦИЯ. ТРАНСЛОКАЦИЯ ВИРИОНА. ПРОНИКНОВЕНИЕ И РАЗДЕВАНИЕ ВИРУСА. ТИПЫ ВИРУС-КЛЕТОЧНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ: ПРОДУКТИВНАЯ, ОГРАНИЧЕННАЯ И АБОРТИВНАЯ ИНФЕКЦИИ

1. Вирусный геном. Свойства и функции.
2. Основные типы вирусных геномов.
3. Механизмы адсорбции вирусов на мембране клетки-хозяина.
4. Механизмы проникновения вируса в клетку.
5. Раздевание вируса. Особенности.
6. Особенности репликации вирусных нуклеиновых кислот в клетке-хозяине.
7. Типы репликации вирусных геномов.
8. Типы сборки вирусных частиц.
9. Способы выхода вируса из клетки-хозяина.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 4.

ТИПЫ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ. ЕСТЕСТВЕННАЯ ЗАЩИТА ОТ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ. СИСТЕМА РЕСТРИКЦИИ/МОДИФИКАЦИИ. СИСТЕМА CRISPR/CAS.

1. Типы вирусных инфекций.
2. Естественные механизмы защиты от вирусов.
3. Роль системы рестрикции/модификации в защите бактерий.
4. Типы R/M-систем.

5. Функции системы CRISPR/cas.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 5.

РНК-САЙЛЕНСИНГ. АПОПТОЗ, ИНДУЦИРОВАННЫЙ ВИРУСАМИ. АНТИВИРУСНОЕ ДЕЙСТВИЕ ИНТЕРФЕРОНА.

1. Механизм РНК-сайленсинга.
2. Роль РНК-сайленсинга в противовирусном иммунитете.
3. РНК-сайленсинг у растений.
4. РНК-сайленсинг у животных.
5. Супрессия РНК-сайленсинга.
6. Апоптоз. Признаки на клеточном уровне.
7. Основные фазы апоптоза.
8. Апоптоз клеток, зараженных вирусом.
9. Механизм действия интерферонов.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 6.

СИСТЕМАТИКА И БИОРАЗНООБРАЗИЕ ВИРУСОВ. РОЛЬ ВИРУСОВ В ЭКОСИСТЕМАХ. ПРОИСХОЖДЕНИЕ И ЭВОЛЮЦИЯ ВИРУСОВ.

1. Принципы систематики вирусов.
2. Образование видовых названий вирусов.
3. Вирусы в экосистемах. Роль.
4. Происхождение вирусов.
5. Эволюция геномов вирусов.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 7.

ВИРУСЫ БАКТЕРИЙ (БАКТЕРИОФАГИ). ИСТОРИЯ ИЗУЧЕНИЯ БАКТЕРИОФАГОВ.

1. История изучения бактериофагов.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 8.

ВИРУСЫ БАКТЕРИЙ. ОСНОВНЫЕ ОСОБЕННОСТИ БАКТЕРИОФАГОВ. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ, КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ УЧЕТ И ПРЕПАРАТИВНОЕ ПОЛУЧЕНИЕ БАКТЕРИОФАГОВ. ВИРУЛЕНТНЫЕ И УМЕРЕННЫЕ ФАГИ. ЖИЗНЕННЫЙ ЦИКЛ БАКТЕРИОФАГОВ (ПРОЦЕСС ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С БАКТЕРИАЛЬНОЙ КЛЕТКОЙ). ПОНЯТИЕ О ТРАНСДУКЦИИ.

1. Особенности бактериофагов как вирусов.
2. Культивирование бактериофагов.
3. Количественный учет бактериофагов.
4. Этапы онтогенеза бактериофагов.
5. Явление лизогении.
6. Лизогенная конверсия. Признаки и роль.
7. Явление псевдолизогении.
8. Общая трансдукция. Суть.
9. Специализированная трансдукция. Суть.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 9

ВИРУСЫ БАКТЕРИЙ. БИОРАЗНООБРАЗИЕ БАКТЕРИОФАГОВ

1. Особенности бактериофагов с геномной dsДНК.
2. Особенности бактериофагов с геномной ssДНК.
3. Особенности бактериофагов с геномной dsДНК.
4. Особенности бактериофагов с геномной ssДНК.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 10.

ВИРУСЫ АРХЕЙ. ВИРУСЫ АРХЕЙ ТИПА EURYARCHAEOTA: ВИРУСЫ ЭКСТРЕМАЛЬНОГАЛОФИЛЬНЫХ АРХЕЙ, ВИРУСЫ МЕТАНОГЕННЫХ И ГИПЕРТЕРМОФИЛЬНЫХ АРХЕЙ. ВИРУСЫ АРХЕЙ ТИПА CRENARCHAEOTA.

1. Вирусы архей типа *Euryarchaeota*.
2. Вирусы экстремальногалофильных архей.
3. Вирусы гипертермофильных архей.
4. Вирусы архей типа *Crenarchaeota*.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 11.

ВИРУСЫ ПРОТИСТОВ, ГРИБОВ И ВОДОРΟΣЛЕЙ. ВИРУСЫ ПРОТИСТОВ И ВОДОРΟΣЛЕЙ, СОДЕРЖАЩИЕ ГЕНОМНУЮ dsДНК. ВИРУСЫ ПРОТИСТОВ, ГРИБОВ И ВОДОРΟΣЛЕЙ, СОДЕРЖАЩИЕ ГЕНОМНУЮ dsРНК. ВИРУСЫ ПРОТИСТОВ И ГРИБОВ, СОДЕРЖАЩИЕ ГЕНОМНУЮ ssРНК(+).

1. Вирусы протистов и водорослей, содержащие геномную dsДНК.
2. Вирусы протистов, грибов и водорослей, содержащие геномную dsРНК.
3. Вирусы протистов и грибов, содержащие геномную ssРНК(+).

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 12.

ВИРУСЫ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ (ФИТОВИРУСЫ). ОСНОВНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ФИТОВИРУСОВ. МЕТОДЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ФИТОВИРУСОВ. СИМПТОМЫ ФИТОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ. СПОСОБЫ ЗАРАЖЕНИЯ ФИТОВИРУСАМИ. ПУТИ РАСПРОСТРАНЕНИЯ ФИТОВИРУСОВ В ТЕЛЕ РАСТЕНИЯ. БИОРАЗНООБРАЗИЕ ФИТОВИРУСОВ.

1. Особенности фитовирусов.
2. Методы культивирования фитовирусов.
3. Способы заражения и симптомы фитовирусной инфекции.
4. Пути распространения фитовирусов в теле растения.
5. Биоразнообразие фитовирусов.
6. Методы борьбы с фитовирусными инфекциями.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 13.

ВИРУСЫ ЖИВОТНЫХ. ОБЩИЕ СВОЙСТВА ВИРУСОВ ЖИВОТНЫХ. ОНТОГЕНЕЗ ВИРУСОВ ЖИВОТНЫХ. СПЕЦИФИЧНОСТЬ ВИРУСОВ ЖИВОТНЫХ. СИСТЕМАТИКА ВИРУСОВ ЖИВОТНЫХ. МЕТОДЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ВИРУСОВ ЖИВОТНЫХ. ТИПЫ ИНФЕКЦИЙ, ВЫЗЫВАЕМЫХ ВИРУСАМИ ЖИВОТНЫХ. МЕТОДЫ НАБЛЮДЕНИЯ И ИЗУЧЕНИЯ СТРОЕНИЯ ВИРУСОВ ЖИВОТНЫХ. БИОРАЗНООБРАЗИЕ ВИРУСОВ ЖИВОТНЫХ.

1. Общие свойства, онтогенез и специфичность вирусов животных.
2. Систематика вирусов животных.
3. Типы инфекций, вызываемых вирусами животных.
4. Методы культивирования вирусов животных.
5. Методы наблюдения и изучения строения вирусов животных.
6. Вирусы животных, содержащие геномную dsДНК.
7. Вирусы животных, содержащие геномную ssДНК.
8. Вирусы животных, содержащие геномную dsРНК.
9. Вирусы животных, содержащие геномную ssРНК(+) и не имеющие стадию обратной транскрипции.
10. Вирусы животных, содержащие геномную ssРНК (+) и имеющие стадию обратной транскрипции.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 14.

ВИРУСЫ ЧЕЛОВЕКА. ВСПЫШКИ НОВЫХ ДЛЯ ЧЕЛОВЕКА ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ.

1. Какую роль в распространении новых вирусов играют глобализация, урбанизация и изменение климата?
2. Какие методы лабораторной диагностики используются для быстрого выявления нового, ранее неизвестного вируса?
3. Последствия вирусных вспышек
4. Стратегии профилактики и контроля