

Министерство образования Республики Беларусь

**Учреждение образования
«Гомельский государственный университет
имени Франциска Скорины»**

Л. В. ШЕВЦОВА, Ю.М. БАЧУРА

ВИРУСОЛОГИЯ

2015

Министерство образования Республики Беларусь

Учреждение образования
«Гомельский государственный университет
имени Франциска Скорины»

Л. В. ШЕВЦОВА, Ю.М. БАЧУРА

ВИРУСОЛОГИЯ

практическое пособие
для студентов 3 курса
специальности 1—31 01 01 02 «Биология»

2015

УДК 578 (075.8)
ББК 28.3я73
Ш 378

Рецензенты: Н. И. Тимохина, кандидат биологических наук, заместитель директора по научной работе ГНУ «Институт радиобиологии», Н. М. Дайнеко, кандидат биологических наук, заведующий кафедрой ботаники и физиологии растений

Рекомендовано к изданию научно-методическим советом учреждения образования «Гомельский государственный университет имени Франциска Скорины»

Шевцова, Л. В.
Ш 378 Вирусология: практическое пособие для студентов 3 курса специальности 1—31 01 01 02 «Биология» (научно-педагогическая деятельность) / Л. В. Шевцова, Ю.М. Бачура; 2015. — 48 с.
ISBN

Практическое пособие ставит своей целью повышение уровня усвоения достаточно сложного материала по разделам «Строение вирусных частиц и функции их отдельных структур», «Основные семейства вирусов животных и растений», «Организация геномов вирусов и особенности их репликации» и адресовано для использования студентами 3 курса специальности 1 — 31 01 01 02 «Биология» (научно-педагогическая деятельность) как на занятиях по соответствующим темам курса «Вирусология», так и для самостоятельной подготовки.

УДК 578. (075.8)
ББК 28.3я73

ISBN

© Шевцова Л.В., Ю.М.Бачура

2015

Содержание

Введение	4
<i>Тема 1</i> Строение вирусных частиц и функции отдельных их структур	4
Лабораторное занятие 1 Морфология и ультраструктура вирусов	10
<i>Тема 2</i> Специальные методы выделения и изучения вирусов	15
Лабораторное занятие 2 Методы выделения, культивирования и идентификации вирусов	20
<i>Тема 3</i> Вирулентные и умеренные фаги. Выделение и индикация бактериофагов	21
Лабораторное занятие 3 Вирулентные и умеренные фаги. Получение фаголизата и индикация бактериофагов	28
<i>Тема 4</i> Бактериофаги как переносчики генетической информации. Организация геномов и репродуктивные тип-варианты вирусов	29
Лабораторное занятие 4 Бактериофаги как переносчики генетической информации. Организация геномов и репродуктивные тип-варианты вирусов	39
<i>Тема 5</i> Взаимодействие вирусов с клеткой-хозяином	40
Лабораторное занятие 5 Взаимодействие вирусов с клеткой-хозяином	44
<i>Тема 6</i> Принципы классификации вирусов животных, человека и растений	44
Лабораторное занятие 2 Основные семейства вирусов животных и растений	47
Литература	47

Введение

Вирусология занимает одно из центральных мест среди медико-биологических наук. Бурное развитие ее в последние два десятилетия обусловлено следующими факторами. Во-первых, вирусные болезни имеют ведущее значение в инфекционной патологии человека. Во-вторых, в настоящее время получила признание вирусная теория этиологии рака, лейкозов и других злокачественных новообразований. В-третьих, на основании изучения природы вирусов и взаимодействия их с клетками хозяев в настоящее время решаются фундаментальные проблемы биологии: раскрытие природы генетического кода, механизмов синтеза нуклеиновых кислот и белков, химического мутагенеза. В-четвертых, вирусы являются особой категорией органической материи, отличающейся от животного и растительного царства. Поэтому в настоящее время изучение разных форм органического мира немыслимо без изучения вирусов.

Основные свойства вирусов, по которым они отличаются от всех остальных живых существ. Они имеют ультрамикроскопические размеры и они не имеют клеточного строения, содержат нуклеиновую кислоту только одного типа – или ДНК, или РНК. Геном у подавляющего большинства вирусов гаплоидный. У них отсутствуют собственные системы мобилизации энергии, нет собственных белоксинтезирующих систем. Вирусы не способны к росту и бинарному делению. Они размножаются *путем воспроизведения* себя из собственной геномной нуклеиновой кислоты. Репликация вирусов происходит в клетках хозяина с использованием белоксинтезирующих и энергетических систем последних. Поэтому вирусы – абсолютные (облигатные) внутриклеточные паразиты.

В настоящее время известны вирусы бактерий (бактериофаги), актиномицетов, грибов, растений и животных.

Вирусология изучает морфологию, строение, экологию, генетику, молекулярную биологию вирусов, процессы их репликации, направление и механизмы эволюции; эпидемиологию, методы лабораторной диагностики, профилактики и лечения вызываемых ими заболеваний.

Тема 1 Строение вирусных частиц и функции их отдельных структур

1.1 Структура вирусных частиц

1.2 Оболочки вирионов

1.3 Типы симметрии

1.4 Функции структурных компонентов вирусных частиц

1.1 Структура вирусных частиц

Вирусы – это мельчайшие живые организмы:

– их размеры варьируют в пределах примерно от 20 до 300 нм (в среднем они в пятьдесят раз меньше бактерий);

– вирусы нельзя увидеть с помощью светового микроскопа, так как их размеры меньше полудлины световой волны. Для изучения морфологии и структуры вирусов используют электронные микроскопы;

– вирусы проходят через фильтры, которые задерживают бактериальные клетки.

Среди вирусов имеются крупные виды (рисунки 1, 2).

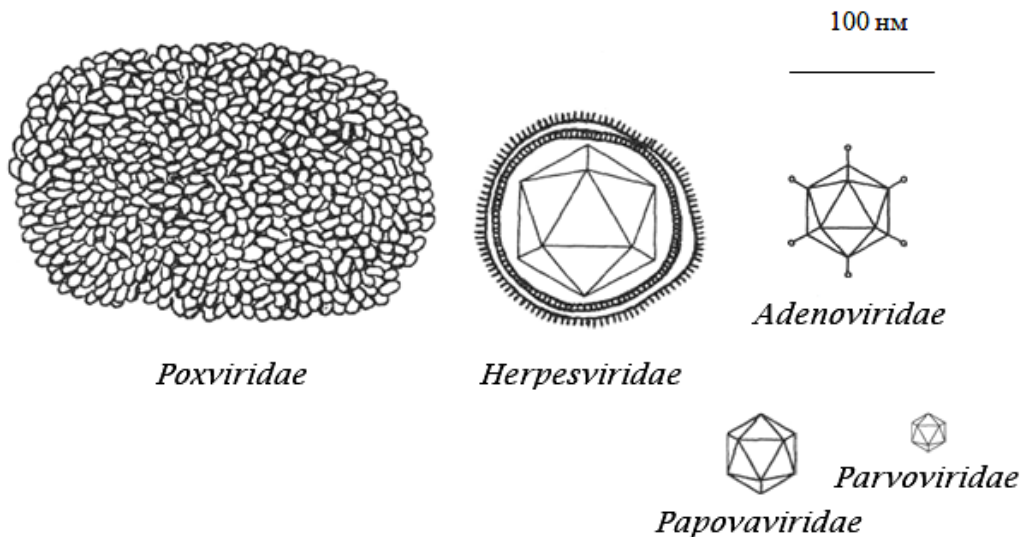


Рисунок 1 – Форма и относительные размеры вирионов некоторых семейств ДНК-содержащих вирусов животных

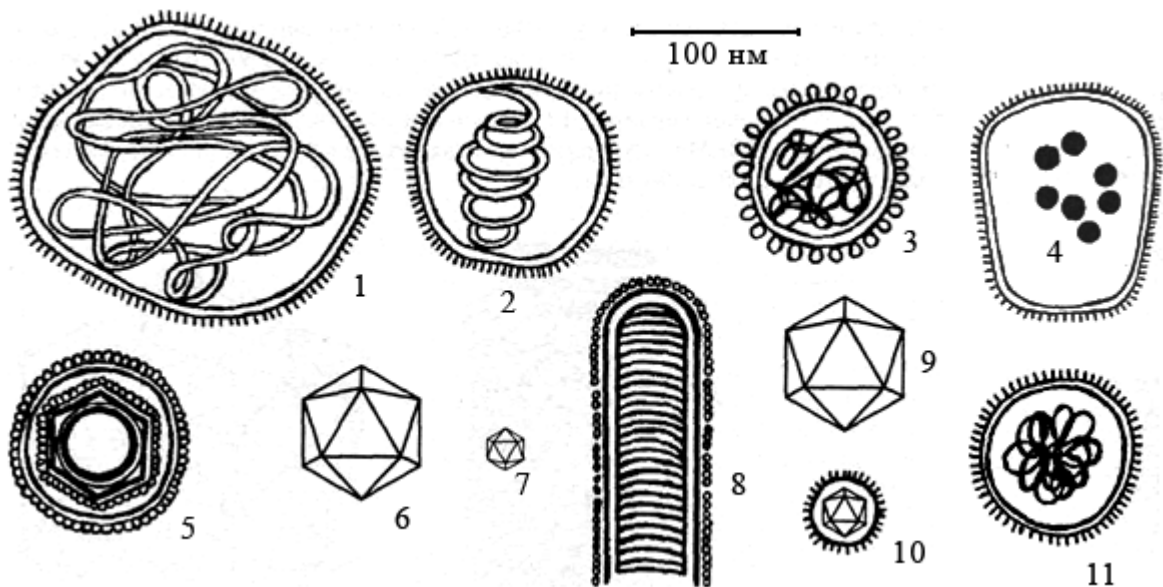


Рисунок 2 – Форма и относительные размеры вирионов некоторых семейств РНК-содержащих вирусов животных:

- 1 – *Paramyxoviridae*; 2 – *Orthomyxoviridae*; 3 – *Coronaviridae*; 4 – *Arenaviridae*;
 5 – *Retroviridae*; 6 – *Reoviridae*; 7 – *Picornaviridae*; 8 – *Rhabdoviridae*;
 9 – *Orbiviridae*; 10 – *Togaviridae*; 11 – *Bunyaviridae*

Например, вирус натуральной оспы достигает 400 нм. По морфологии выделяют вирусы палочковидные (возбудитель лихорадки Эбола), пулевидные (вирус бешенства), сферические (герпесвирусы), овальные (вирус оспы), а также бактериофаги, имеющие сложную форму (имеют головку и хвостик).

Различают две формы существования вирусов. Внеклеточная форма – *вирион* – включает в себя все составные элементы (капсид, нуклеиновую кислоту, структурные белки, ферменты и др.). Внутриклеточная форма – *вирус* – может быть представлена лишь одной молекулой нуклеиновой кислоты, так как, попадая в клетку, вирион распадается на составные элементы.

По строению различают два типа вирусных частиц: простые и сложные. *Простые* («голые») *вирусы* состоят из сердцевины и белковой оболочки – капсида. *Сложные* («одетые») *вирусы* имеют дополнительную липопротеидную оболочку – суперкапсид или пеплос.

Внутренняя структура простых и сложных вирусов сходна. *Сердцевина* вируса – вирусная нуклеиновая кислота (ДНК либо РНК) – вирусный геном. Наиболее простой вирусный геном кодирует 3-4 белка, наиболее сложный – более 50 полипептидов.

Снаружи нуклеиновая кислота покрыта белковым чехлом – капсидом, образуя комплекс – *нуклеокапсид*, по химической природе представляющий собой нуклеопротеид.

1.2 Оболочки вирионов

Капсид (лат. *capsa*, ящик) часто построен из повторяющихся субъединиц – капсомеров. *Капсомеры* являются морфологическими единицами вирусов (рисунок 3). Число капсомеров строго специфично для каждого вида и зависит от размеров и морфологии вирионов.

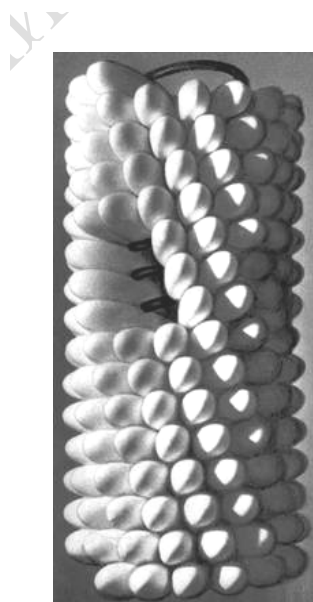


Рисунок 3 – Модели вирусных частиц. Часть палочки вируса мозаичной болезни табака; видны капсомеры и инкрустированные в них витки нуклеиновой кислоты.

Капсомеры состоят из молекул белка – *протомеров*. Протомеры – это структурные единицы капсомера. Протомеры могут быть мономерными (содержать один полипептид) либо полимерными (включать несколько полипептидов). Капсид простых вирусов представлен α -спиральными белками.

Основные функции капсида – защита вирусного генома от внешних воздействий, обеспечение адсорбции вириона к клетке, проникновение его в клетку путём взаимодействия с клеточными рецепторами. Белки капсида обладают антигенными свойствами.

Комплекс капсида и вирусного генома называют *нуклеокапсидом*.

Дополнительная оболочка сложных вирусов – *суперкапсид* образован из плазматической мембраны клетки-хозяина. Суперкапсид встречается только у сравнительно крупных вирусов (грипп, герпес) и выполняет защитную функцию. В составе суперкапсида выделяют внутренний белковый слой (М-белок), внешний объёмный слой липидов и углеводов (компонентов мембран клетки-хозяина) и поверхностные гликопротеиды. Вирусспецифические гликопротеиды встраиваются в липидный бислой, образуя разные по форме выпячивания, например, шипы.

1.3 Типы симметрии вирусов

Капсомеры вириона организованы в один или два слоя по двум типам симметрии – *кубическому* или *спиральному* (рисунок 4).

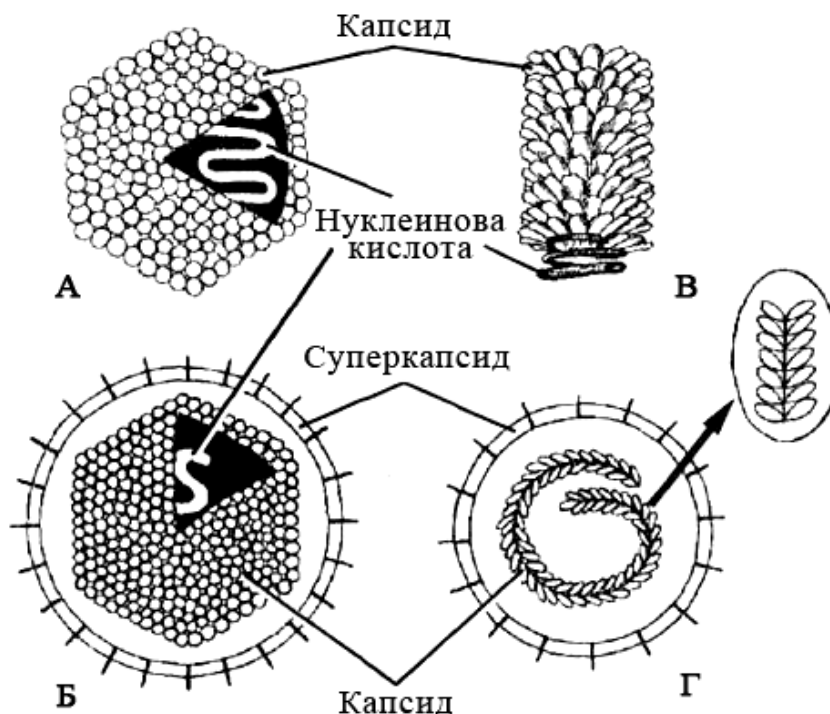


Рисунок 4 – Основные типы симметрии вирусов:

А – кубический («голый» вирион); Б – кубический («одетый» вирион); В – спиральный («голый» вирион); Г – спиральный («одетый» вирион)

Симметричность капсида связана с тем, что для упаковки генома требуется большое количество капсомеров, а компактное их соединение возможно лишь при условии симметричного расположения субъединиц. Формирование капсида напоминает процесс кристаллизации и протекает по принципу самосборки.

Спиральная симметрия. В нуклеокапсиде взаимодействие нуклеиновой кислоты и белка осуществляется по одной оси вращения. Каждый вирус со спиральной симметрией обладает характерной длиной, шириной и периодичностью нуклеокапсида. Нуклеокапсиды большинства патогенных для человека вирусов имеют спиральную симметрию. К этой группе относят и вирус табачной мозаики (рисунок 5), капсид которого образован 2130 одинаковыми белковыми субъединицами. *Организация по принципу спиральной симметрии придаёт вирусам палочковидную форму.* При спиральной симметрии белковый чехол лучше защищает наследственную информацию, но требует большого количества белка, так как покрытие состоит из сравнительно крупных блоков.

Кубическая симметрия. У подобных вирусов нуклеиновая кислота окружена капсомерами, образующими фигуру *икосаэдра* – многогранника с 12 вершинами, 20 треугольными гранями и 30 углами (рисунок 6). *Организация по принципу кубической симметрии придаёт вирусам сферическую форму.* Принцип кубической симметрии – самый экономичный для формирования замкнутого капсида, так как для его организации используются сравнительно небольшие белковые блоки, образующие большое внутреннее пространство, в которое свободно укладывается нуклеиновая кислота.

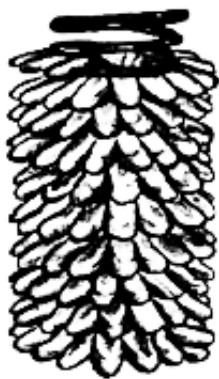


Рисунок 5 – Вирус табачной мозаики (спиральный тип симметрии)

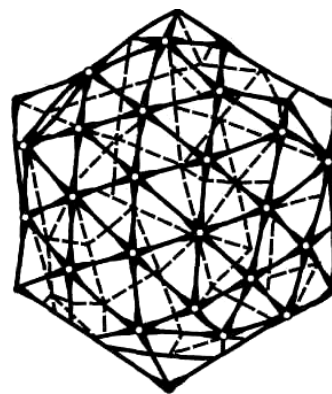


Рисунок 6 – Один из возможных вариантов кубической симметрии

Двойная (смешанная) симметрия. Некоторые бактериофаги (вирусы бактерий) имеют двойную симметрию: головка организована по принципу кубической симметрии, отросток – по принципу спиральной симметрии (рисунок 7). **Отсутствие постоянной симметрии.** Для вирусов больших размеров (для поксвирусов) характерно отсутствие постоянной симметрии.



Рисунок 7 – Бактериофаг
(смешанный тип симметрии)

1.4 Функции структурных компонентов вирусных частиц

Белки. В состав нуклеокапсидов входят *внутренние белки*, обеспечивающие правильную упаковку генома, а также выполняют структурную и ферментативную функции.

Вирусные ферменты разделяют на вирионные и вирусиндуцированные. В капсидах могут присутствовать ферменты обеих групп.

Вирионные ферменты входят в состав вирионов и их также подразделяют на две функциональные группы:

- ферменты, обеспечивающие проникновение вирусных нуклеиновых кислот в клетку и выход дочерних популяций;
- ферменты, участвующие в транскрипции и репликации вирусного генома (например, обратная транскриптаза).

Вирусиндуцированные ферменты закодированы в вирусном геноме.

Поверхностные белки «голых» вирусов обеспечивают взаимодействие вирусов с клеточными рецепторами и последующее проникновение в клетку путём эндоцитоза. Суперкапсидные *гликопротеиды*, образующие шипы, распознают клеточные рецепторы и связываются с ними, обеспечивают слияние вирусной мембраны с мембраной клетки.

Большинство «одетых» вирусов имеют поверхностные специальные *F-белки* (лат. *fusio*, слияние), обеспечивающие слияние вирусных суперкапсидов и клеточных мембран.

M-белки – матричные белки формируют структурный слой на внутренней поверхности суперкапсида и способствуют взаимодействию его с белками нуклеокапсида, что важно на заключительных этапах самосборки вирионов.

Липиды суперкапсида стабилизируют структуры вирусов. Деградация или потеря липидов приводит к потере инфекционных свойств, так как такие вирусные частицы теряют стабильность своего состава и, соответственно, способность к заражению клеток. Состав липидов обычно зависит от характера «почкования» вирусной частицы. Например, у вируса гриппа состав липидного бислоя аналогичен таковому в клеточных мембранах. Герпесвирусы почкуются

через ядерную мембрану, поэтому набор липидов суперкапсида отражает состав липидов ядерной мембраны.

Вопросы для самоконтроля

- 1 Какие формы существования различают у вирусов?
- 2 Какие свойства характеризуют вирусы как особое царство ультрамикроскопических организмов?
- 3 Приведите примеры разнообразия морфологии вирусов.
- 4 Назовите структурные элементы простых и сложных вирусов?
- 5 Что является морфологической и структурной единицами капсида?
- 6 Какое происхождение имеет суперкапсид сложных вирусов?
- 7 Дайте характеристику кубическому, спиральному и смешанному типам симметрии и приведите примеры вирусов с этими типами симметрии.
- 8 Какие функции выполняют капсид и суперкапсид?
- 9 Назовите белковые структуры вирусной частицы и их функции.

Лабораторное занятие 1 Морфология и ультраструктура вирусов

Цель занятия: освоить бактериоскопический метод выявления вирусов в материалах и изучить особенности морфологии и ультраструктуры вирусов с использованием метода электронной микроскопии.

Материалы и оборудование: 1) электронные микрофотографии и демонстрационные рисунки: а) простых и сложных вирусов, б) вирусов с разными типами симметрии, в) вирусов с оболочками разной архитектуры; 2) световой микроскоп; 3) флюоресцентный микроскоп; 4) музейные препараты с вирусными включениями в клетках пораженных тканей растений и животных; 5) препарат или фотография флюоресцентной микроскопии препарата вирусинфицированных клеток.

Задание 1: проведите вирусоскопическое исследование демонстрационных препаратов клеток, пораженных вирусами.

Ход работы

Прочтите приведенное ниже краткое описание микроскопических методов, используемых для выявления вирусов в материалах (вирусоскопия в иммерсионном и люминесцентном микроскопах).

Вирусоскопия. В иммерсионном световом микроскопе обнаруживаются самые крупные элементарные тельца. Легче при вирусных инфекциях выявить внутриклеточные включения (рисунок 8).

В основном они представлены скоплениями вирионов вперемешку с реактивными клеточными продуктами и в зависимости от места репликации вирионов находятся в цитоплазме или ядре клеток-хозяев. В частности, цитоплазматическими включениями являются тельца Гуарниери в эпителиальных клетках, скопления реовирусов и вирусов гриппа в них, тельца Бабеша-Негри – в нейронах. Ядерные адено-, папова- и герпесвирусные включения состоят из кле-

точного материала. Изредка в одной и той же клетке вирусы, например, коревой, формируют цитоплазматические и ядерные включения.

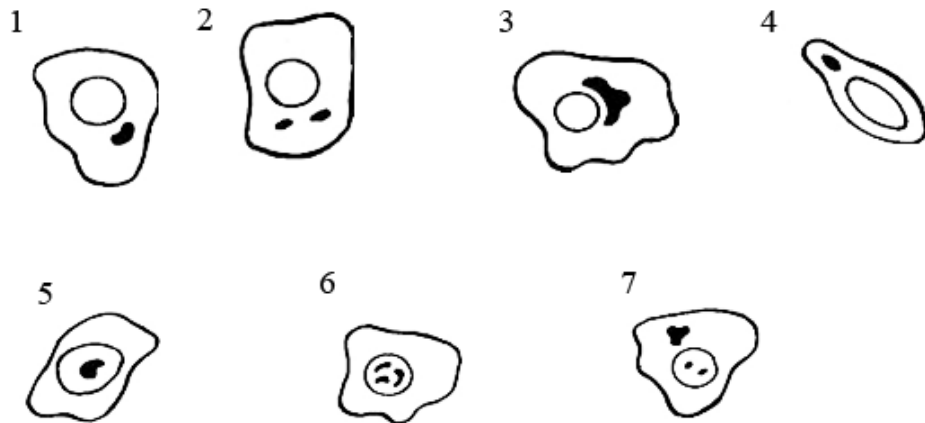


Рисунок 8 – Вирусные включения:

1 – тельца Гуарниери в клетке, зараженной вирусом оспы; 2 – включения в цилиндрическом эпителии, зараженном вирусом гриппа; 3 – включения в эпителии, зараженном реовирусом; 4 – тельца Бабеша-Негри в нейрочитах; 5,6 – внутриядерные включения в эпителии, зараженном герпес- и аденовирусом; 7 – внутриядерные и цитоплазматические включения в эпителии, зараженном вирусом кори

По форме, размерам, структуре, отношению к красителям вирусные включения строго специфичны. Например, тельца Гуарниери имеют округлую, серповидную или амебоидную форму диаметром 1–10 мкм, тельца Бабеша-Негри – овальные или эллипсоидные, достигающие 20 мкм, включения реовирусов серповидные, наполовину охватывающие клеточное ядро, коревые включения – в виде почкующихся мелких дрожжей (рисунок 9).



Рисунок 9 – Тельца Бабеша-Негри в нервных клетках головного мозга

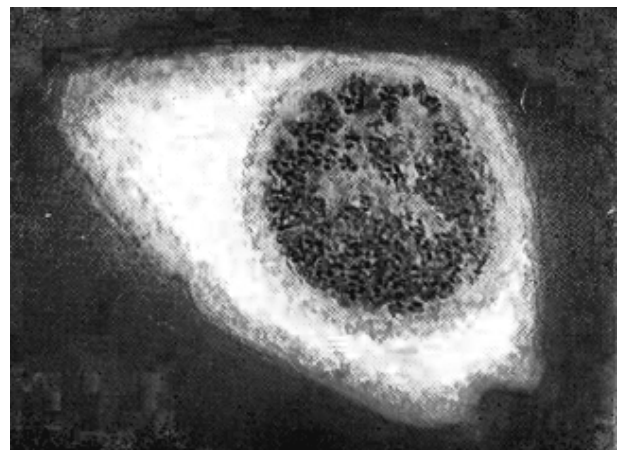


Рисунок 10 – Вирус гриппа в культуре клеток через 12 ч после инфицирования (иммунофлюоресцентная микроскопия, \square 1200).

В препаратах, обработанных мечеными антителами под люминесцентным микроскопом обнаруживают вне- и внутриклеточно расположенные вирионы в виде разноцветных точек и конгломератов в зависимости от природы используемого флюорохрома (рисунок 10). Видны светящиеся комплексы в ядре и на внутренней поверхности плазмалеммы.

Выполните задания, указанные в протоколе № 1 дневника лабораторных работ по вирусологии.

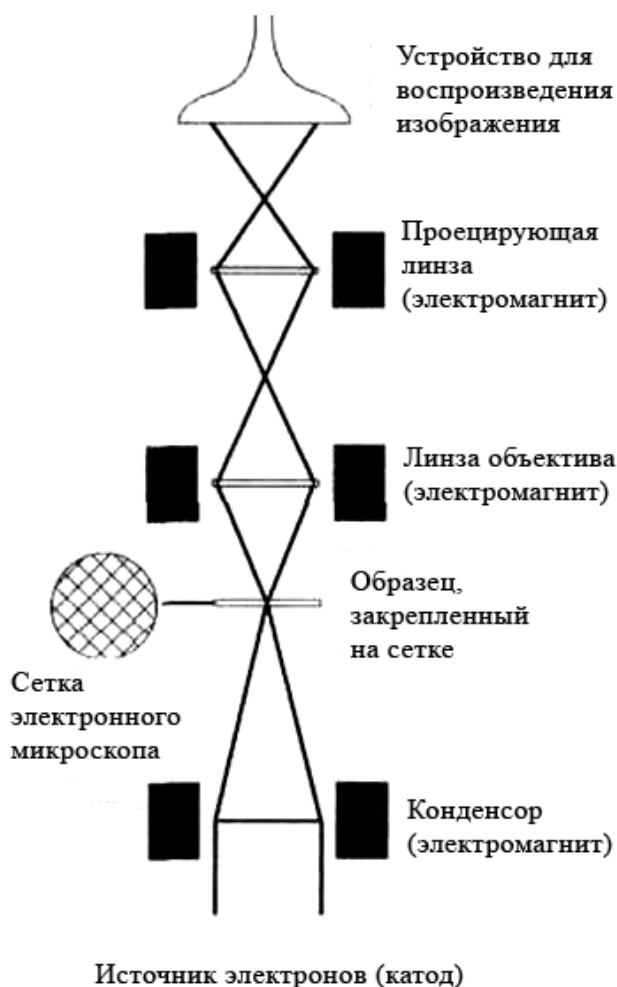
Задание 2: изучите особенности электронной микроскопии и ее возможности при изучении морфологии и ультраструктуры вирусов.

Ход работы

1 Ознакомьтесь с приведенной ниже общей характеристикой метода электронной микроскопии. На рисунке 11 показан просвечивающий электронный микроскоп.



А



Б

Рисунок 11 – Внешний вид и схема электронного микроскопа

Электронная микроскопия. Теоретически разрешение просвечивающего электронного микроскопа составляет 0,002 нм; реальное разрешение современных микроскопов приближается к 0,1 нм. На практике разрешение для биологических объектов достигает 2 нм. В электронном микроскопе вирусы идентифицируют по тонким деталям их ультраструктуры. С этой целью получают микрофотографии. При этом содержащий вирусы материал суспендируют в хорошо испаряющейся среде и наносят на сетку с подложкой, представляющей собой пленку из коллодия или из чистого углерода, слабо поглощающую электроны. Улучшение электронно-микроскопического изображения вирусов достигается увеличением их электронной плотности путем воздействия на них паров четырехоксида осмия. Широко используются также методы напыления на вирус-содержащие материалы тяжелых металлов (золото, палладий, уран). Конфигурация вирионов отчетливо отпечатывается на матрицах-репликах высушенных пленок пластмассы, раствором которых они заливаются. Симметрию и распределение белковых субъединиц в блоке-ансамбле вирусных кристаллов изучают с помощью рентгеноструктурного анализа.

Просвечивающий электронный микроскоп (рисунок 11) состоит из колонны, через которую в вакууме проходят электроны, излучаемые катодной нитью. Пучок электронов, фокусируемый кольцевыми магнитами, проходит через подготовленный образец. Характер рассеивания электронов зависит от плотности образца. Проходящие через образец электроны наблюдают на флюоресцирующем экране и регистрируют при помощи фотопластинки.

Сканирующий (растровый) электронный микроскоп РЭМ применяют для получения трёхмерного изображения поверхности исследуемого объекта.

2 Рассмотрите электронные микрофотографии вирусов (рисунки 12-15, демонстрационный материал).

3 В протоколе занятия кратко опишите технологию электронной микроскопии.



Рисунок 12 – Аденовирусы

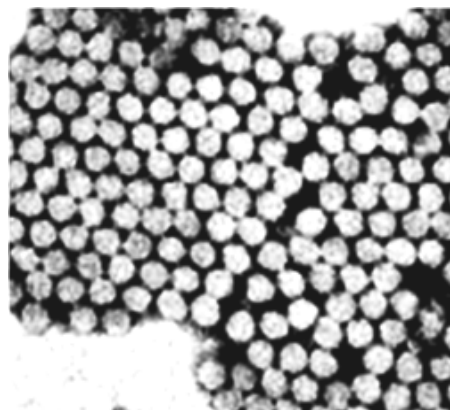


Рисунок 13 – Вирусы гепатита А

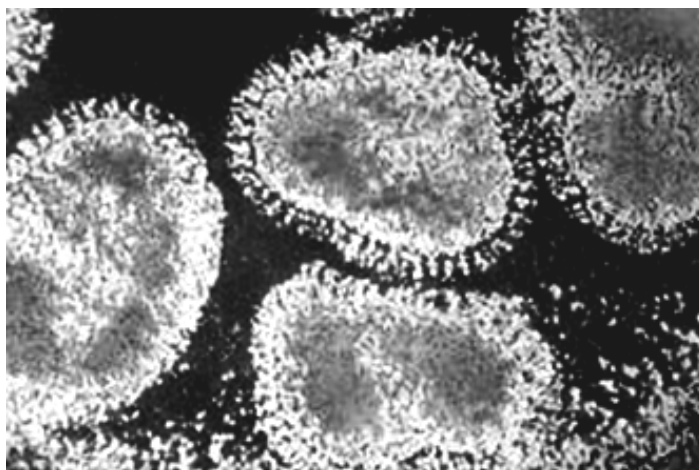


Рисунок 14 – Вирусы гриппа



Рисунок 15 – Электронная микрофотография фага эшерихии коли

Задание 3: изучите структуру вируса натуральной оспы.

Ход работы

1 Рассмотрите электронную микрофотографию вириона оспы (рисунок 16).



Рисунок 16 – Вирион натуральной оспы (электронная микроскопия, 230 000)

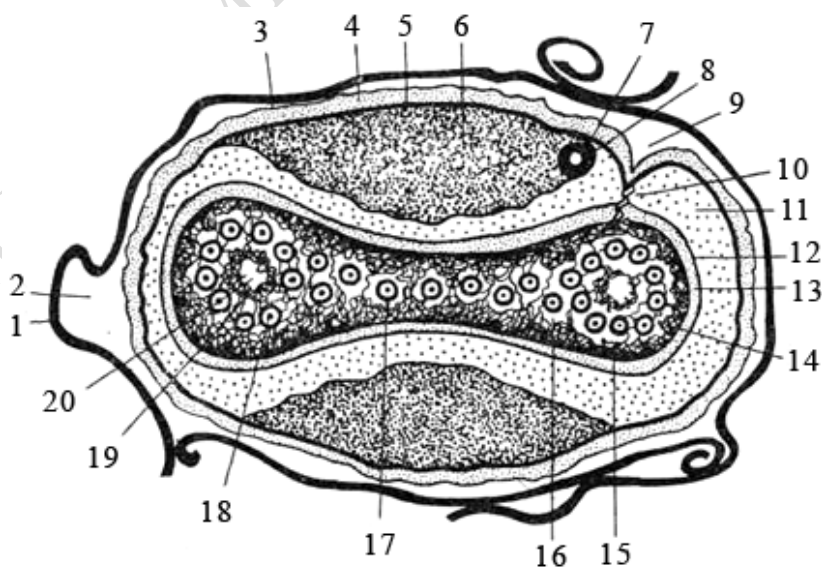


Рисунок 17 – Схема строения вириона оспы:

2 Изучите схему строения вируса натуральной оспы (рисунок 17) и найдите соответствия структурных элементов на схеме и фотографии: 1 – фрагмент цитоплазматической оболочки, захваченной вирионом при выходе из клетки; 2 – пространство между этой оболочкой и поверхностью вириона; 3 – внеш-

няя осмиофильная мембрана оболочки вириона; 4 – средняя осмиофильная мембрана оболочки вириона; 5 – внутренняя мембрана оболочки вириона; 6 – боковое (латеральное) тело; 7 – фрагмент клеточной оболочки; 8 – внутривирусная гранула; 9 – локальное втяжение оболочки; 10 – тяж, связывающий компонент нуклеоида с оболочкой; 11 – вирусоплазма; 12 – внешняя осмиофильная мембрана оболочки нуклеоида; 13 – средняя осмиофобная мембрана оболочки нуклеоида; 14 – внутренняя осмиофильная мембрана оболочки нуклеоида; 15 – нуклеоидоплазма; 16 – осмиофобный компонент S-образной структуры; 17 – кольцо – срез спиральной укладки ДНК (гипотеза); 18 – центр этого кольца; 19 – внутренний компонент S-образной структуры нуклеоида; 20 – центральный компонент S-образной структуры нуклеоида.

Тема 2 Специальные методы выделения и изучения вирусов

2.1 Методы культивирования вирусов

2.2 Методы выделения и индикации вирусов

2.3 Методы идентификации вирусов

2.1 Методы культивирование вирусов

Лабораторные исследования при проведении идентификации вирусов и диагностике вирусных инфекций включают следующие этапы: выделение, культивирование, индикация (выявление) и идентификация вирусов.

Вирусы не растут на искусственных питательных средах, а размножаются только внутриклеточно. Крупным достижением было предложение Р. Гудпасчура в 1932 г. использовать для культивирования вирусов куриные эмбрионы. Окончательное решение проблемы культивирования вирусов оказалось возможным лишь после того, как были разработаны основные способы культивирования клеток вне организма.

Использование куриных эмбрионов. Куриные эмбрионы – практически идеальные модели для культивирования некоторых вирусов (например, гриппа и кори). Эмбрионы применяют для первичного выделения вирусов из патологического материала; для пассирования и сохранения их, а также для получения необходимых количеств вируса. Некоторые возбудители (например, герпесвирусы) вызывают характерные изменения (по ним можно распознавать заболевание).

Для заражения обычно используют куриные эмбрионы 7–12-дневного возраста. Перед заражением определяют жизнеспособность эмбриона путем овоскопирования (просматривают в проходящем свете). Куриные эмбрионы заражают вирусосодержащим материалом в асептических условиях стерильными инструментами, предварительно обработав скорлупу над воздушным пространством йодом и спиртом.

Заражение проводят на хорион-аллантаисную оболочку, в амниотическую или аллантаисную полость, либо в желточный мешок (рисунок 18). Выбор метода заражения зависит от биологических свойств вируса.

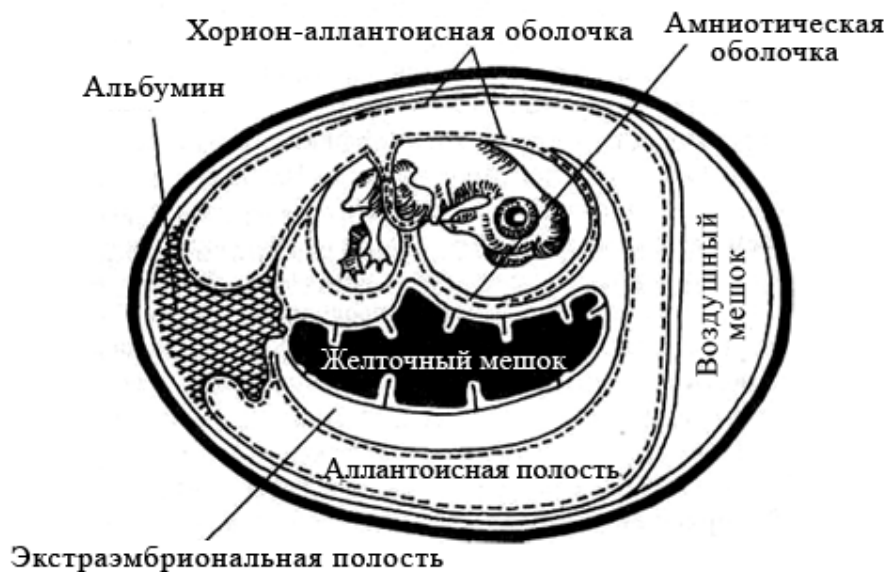


Рисунок 18 – Схематическое изображение развивающегося куриного эмбриона

Культура клеток. Вначале был использован *метод переживающих тканей*. Он заключался в том, что в колбу, содержащую питательную среду, внесли кусочек ткани. Клетки некоторых тканей в таких условиях могут переживать (но не размножаться) до 30 дней, а в них могут размножаться вирусы. Однако этот способ давал очень небольшой выход вирусов. Необходимо было разработать условия, при которых клетки ткани могли бы свободно размножаться.

Для получения культур клеток необходимо было решить четыре главных задачи:

- получить в необходимом количестве свободные (т. е. изолированные друг от друга) клетки;
- создать такие питательные среды и условия, в которых клетки могли бы активно размножаться;
- обеспечить условия, при которых в культурах клеток не могли бы размножаться бактерии;
- определить методы, с помощью которых можно было бы распознавать рост вируса в культуре клеток и идентифицировать его.

Для выделения изолированных (разобщенных), но жизнеспособных клеток из разрушенных тканей, стали использовать обработку их слабым раствором трипсина, разрушающего межклеточные мостики. Для культивирования клеток были предложены различные среды, содержащие все необходимые для размножения клеток питательные вещества (аминокислоты, основания, витамины и другие), минеральные соли, имеющие оптимальную pH и т. д. К питательным средам добавляли индикатор, по изменению цвета которого можно было судить о метаболизме клеток и их размножении. Было установлено, что в качестве ос-

новы, на которой клетки размножаются и образуют монослой, может быть использовано хорошо обработанное стекло пробирок и колб. Для подавления возможного роста бактерий вирусосодержащий материал перед посевом его в культуры клеток стали обрабатывать антибиотиками.

В 1949 г. Дж. Эндерс, Т. Веллер и Ф. Роббинс показали, что вирус полиомиелита хорошо размножается в *первично-трипсинизированных культурах* клеток, полученных из почек обезьян. Основным недостатком первично-трипсинизированных клеток заключается в том, что после нескольких пересевов они перестают размножаться. Поэтому предпочтением стали пользоваться культуры таких клеток, которые способны размножаться *in vitro* бесконечно долго. Такие *перевиваемые культуры* клеток (клеточные линии характеризуются бессмертием и гетероплоидным кариотипом) получают из опухолевых тканей (HeLa получена из карциномы шейки матки, HEp-2 – из карциномы гортани; Детройт-6 – из метастаза рака легкого в костный мозг; RH – из опухоли почки человека) или из мутантных клеток с полиплоидным набором хромосом. Однако опухолевые клетки нельзя применять для получения вакцин. Для этих целей используют только культуры таких клеток, которые не содержат никаких контаминантных вирусов и не обладают злокачественностью. Лучше всего этим требованиям отвечают культуры диплоидных клеток.

Полуперевиваемые (диплоидные) культуры клеток – клетки одного генотипа, способные *in vitro* выдерживать 50–100 пассажей, сохраняя при этом свой исходный диплоидный набор хромосом. Диплоидные линии фибробластов эмбриона человека используются как для диагностики вирусных инфекций, так и при производстве вирусных вакцин. Как оказалось, вирусы могут размножаться не только в культурах клеток, образующих монослой на стекле пробирок, но и в суспензиях живых клеток.

Для обеспечения жизнедеятельности культивируемых клеток необходимы питательные среды. По назначению они делятся на ростовые и поддерживающие. В *ростовых* питательных средах должно содержаться больше питательных веществ, обеспечивающих активное размножение клеток и формирование монослоя. *Поддерживающие* среды обеспечивают переживание клеток в уже сформированном монослое в период размножения в них вирусов.

2.2 Методы выделения и индикации вирусов

Выделение вирусов в культурах клеток. При выделении вирусов из различных инфекционных материалов (кровь, моча, слизистые отделяемые, смывы из органов) применяют культуры клеток, обладающих наибольшей чувствительностью к предполагаемому вирусу. Для заражения используют культуры в пробирках с хорошо развитым монослоем клеток. Перед заражением клеток питательную среду удаляют и в каждую пробирку вносят по 0,1–0,2 мл взвеси исследуемого материала, предварительно обработанного антибиотиками для уничтожения бактерий и грибов. После 30–60 мин контакта вируса с монослоем клеток удаляют избыток материала, в культуру вносят поддерживающую среду и пробы оставляют в термостате до выявления признаков размножения вируса.

Выделение вирусов на лабораторных животных. При невозможности выделить и идентифицировать вирус стандартными методами *in vitro* инфекционный материал вводят чувствительным к возбудителю животным, и после развития типичного инфекционного процесса проводят повторное заражение чувствительных клеточных культур. Наиболее часто используют мышей, кроликов и обезьян; для выделения некоторых вирусов (например, вирусов Коксаки) заражают мышат-сосунков. Вследствие дороговизны и сложности содержания лабораторных животных, практически повсеместно их вытеснили клеточные культуры. Тем не менее животные модели активно используют для изучения особенностей патогенеза и формирования иммунных реакций при вирусных инфекциях.

Таким образом, для выделения чистых культур вирусов в лабораторных условиях в настоящее время используются следующие живые объекты (биологические модели): 1) культура клеток (тканей, органов); 2) куриные эмбрионы; 3) лабораторные животные.

Индикация вируса в курином эмбрионе. Индикация вируса в курином эмбрионе производится по гибели эмбриона, положительной реакции гемагглютинации на стекле с аллантоисной или амниотической жидкостью, по образованию фокусных поражений («бляшек») на хорион-аллантоисной оболочке.

Индикация вирусов в культурах клеток. Индикатором наличия вируса в зараженных культурах клеток может служить:

1) развитие специфической дегенерации клеток – *цитопатическое действие вируса* (ЦПД), имеющее три основных типа: крупно- или мелкоклеточная дегенерация; образование многоядерных гигантских клеток (*симпластов*); развитие очагов клеточной пролиферации, состоящих из нескольких слоев клеток (*гроздевидная дегенерация клеток*).

Различают два механизма гибели клеток, вызываемой вирусами, – некроз и апоптоз. *Некроз* происходит из-за необратимых нарушений целостности клеточных мембран, *апоптоз* – вследствие фрагментации ядерной ДНК под действием клеточной эндонуклеазы.

Цитопатические эффекты оценивают при микроскопии клеточных культур. По степени поражения клеток выделяют вирусы с высокой или умеренной цитопатогенностью:

2) *обнаружение внутриклеточных включений*, располагающихся в цитоплазме и/или в ядрах пораженных клеток;

3) *положительная реакция гемагглютинации (РГА) или гемадсорбции (РГАдс)*. Некоторые вирусы, в частности, вирус гриппа, обладают особыми рецепторами (гемагглютинидами), с помощью которых они адсорбируются на эритроцитах и вызывают их склеивание (гемагглютинацию). Такие вирусы легко обнаруживаются с помощью реакции гемагглютинации или гемадсорбции (эритроциты адсорбируются на инфицированных вирусами клетках культуры тканей);

4) *феномен бляшкообразования*. Широкое распространение получил предложенный в 1952 г. Р. Дюльбекко *метод бляшек* (негативных колоний), позволяющий производить количественное определение вирусов. Для выделения ви-

русов монослой клеток после удаления питательной среды заражают вирусосодержащим материалом и покрывают слоем агара, содержащего индикатор нейтральный красный. Чашки (флаконы) инкубируют при 37 °С. Через 48–96 ч выявляются пятна – бляшки. Они имеют диаметр 1–3 мм и выглядят неокрашенными на розовом фоне. Пятна возникают за счет цитопатического действия вируса;

5) *цветная реакция Солка*. О росте вирусов в клетках можно судить с помощью индикатора, добавляемого к питательной среде. Если клетки активно осуществляют метаболизм, рН среды сдвигается в кислую сторону, и среда окрашивается в желтый цвет. В случае размножения вируса клетки погибают, рН среды мало меняется, и она сохраняет первоначальный (малиновый) цвет или (при нейтральной рН) приобретает оранжевый;

б) *реакция интерференции* (используется при отсутствии ЦПД, гемагглютинации и гемадсорбции): исследуемая культура повторно заражается вирусом, вызывающим ЦПД. В положительном случае ЦПД будет отсутствовать (реакция интерференции положительна). Если в исследуемом материале вируса не было, наблюдается ЦПД.

Кроме того, для обнаружения вируса в культурах клеток могут быть использованы различные серологические реакции.

Индикация вирусов на лабораторных животных. Индикация вируса основана на обнаружении у животных признаков инфекционного заболевания, регистрации их гибели, изучении характера патоморфологических и патогистологических изменений в тканях и органах, выявлении положительной реакции гемагглютинации.

2.3 Методы идентификации вирусов

Определение типа вируса (его идентификация) основано на нейтрализации биологической активности вируса с помощью типоспецифических сывороток. Конечный результат ее может быть установлен на основании следующих признаков:

1) *нейтрализация цитопатического действия*: в культуральную среду, содержащую изучаемый вирус, вносят коммерческую сыворотку (например, к вирусу краснухи при подозрении на неё), инкубируют и заражают вторую культуру; через 1–2 дня в неё вносят известный цитопатогенный вирус. При наличии цитопатогенного эффекта делают вывод о том, что первая культура была заражена вирусом, соответствовавшим антителам примененной сыворотки;

2) *нейтрализация реакции гемадсорбции*;

3) *изменение проявления цветной пробы*;

4) *задержка (торможение) реакции гемагглютинации*: смешивают культуральную среду, содержащую возбудитель, с известной коммерческой антисывороткой и вносят в культуру клеток. После инкубации определяют способность культуры к гемагглютинации и при её отсутствии делают заключение о несоответствии вируса антисыворотке.

5) *нейтрализация в опытах на животных*.

Таким образом РН (реакция нейтрализации) основана на подавлении соответствующей реакции, феномена, развития инфекционного процесса после внесения в культуру или введения в организм животного смеси вируса со специфическими АТ, содержащимися в диагностической сыворотке.

Вопросы для самоконтроля

- 1 Какие этапы включают в себя лабораторные исследования при идентификации вирусов и диагностике вирусных инфекций?
- 2 Какие биологические модели используются для выделения и культивирования вирусов человека и животных?
- 3 Как происходит заражение куриных эмбрионов в лабораторных условиях?
- 4 Какие методы получения культуры клеток вы знаете?
- 5 Как проводят идентификацию вирусов в курином эмбрионе и на лабораторных животных?
- 6 Какие существуют методы индикации вирусов на культуре клеток?
- 7 В чем заключается назначение и сущность реакций нейтрализации вирусов?
- 8 Назовите способы постановки реакций нейтрализации вирусов.

Лабораторное занятие 2

Методы выделения, культивирования и идентификации вирусов

Цель занятия: изучить принципы и методы выделения, культивирования и идентификации вирусов.

Материалы и оборудование: 1) световой микроскоп; 2) препараты для микроскопии (или фотографии препаратов) культур клеток неинфицированных вирусами и инфицированных вирусами: а) с крупноклеточной дегенерацией клеток, б) с мелкоклеточной дегенерацией клеток, в) с образованием симпластов, г) с развитием очагов клеточной пролиферации, д) с внутриклеточными включениями; 4) демонстрационные препараты с положительной реакцией гемагглютинации и гемадсорбции; феноменом бляшкообразования; с цветной реакцией Солка; 5) демонстрационные варианты постановки реакции нейтрализации вирусов.

Ход работы по каждому из приведенных ниже заданий смотрите в протоколе дневника лабораторных работ по вирусологии (протокол № 2).

Задание 1: проведите индикацию вирусов в культурах клеток по цитопатическому действию.

Задание 2: проведите индикацию вирусов в культурах клеток по наличию внутриклеточных включений.

Задание 3: проведите индикацию вирусов в культурах клеток с использованием реакции гемагглютинации и гемадсорбции.

Задание 4: проведите индикацию вирусов в культурах клеток с использованием феномена бляшкообразования.

Задание 5: проведите индикацию вирусов в культуре клеток с использованием цветной реакции Солка.

Задание 6: проведите идентификацию вируса с использованием реакции нейтрализации.

Тема 3 Вирулентные и умеренные фаги. Выделение и индикация бактериофагов

3.1 Основные понятия, строение бактериофагов

3.2 Жизненный цикл инфекционных фагов

3.3 Выделение бактериофагов из окружающей среды, получение фаголизата, обнаружение (индикация) бактериофагов

3.1 Основные понятия, строение бактериофагов

Бактериофаги (или просто фаги) – вирусы бактерий. **Бактериофагия** – процесс взаимодействия фагов с бактериями, заканчивающийся разрушением последних (от *лат. bacteriophaga* – пожирающий бактерии).

Ф. Туорт в 1915 г. впервые описал «остекленение» (лизис) колоний белого стафилококка. Целостное учение о бактериофагах как о вирусах связано с именем канадского ученого Ф. д'Эрелля, который обнаружил агент, способный разрушать дизентерийные бактерии. Д'Эрелль назвал его *Bacteriophagum intestinale*, т. е. выделенный из кишечника пожиратель бактерий.

Бактериофаги распространены повсеместно. Они встречаются в почве, воде, кишечном тракте человека и животных, гнойных выделениях и т. п. Особенно много фагов в сточных водах.

Фагам присущи все биологические особенности, которые свойственны вирусам. Они устойчивы в пределах рН от 5,0 до 8,0, большинство из них не инактивируется холодными водными растворами глицерина и этилового спирта. На них не действуют такие ферментные яды, как цианид, фторид, динитрофенол, а также хлороформ и фенол. Фаги хорошо сохраняются в запаянных ампулах и в лиофилизированном состоянии, но легко разрушаются при кипячении, действии кислот, химических дезинфектантов, при УФ облучении.

Фаги по содержанию нуклеиновых кислот подразделяются на **ДНК-** и **РНК-содержащие**.

По способности вызывать инфекцию различают фаги:

- **инфекционные**, т. е. способные вызвать разные формы фаговой инфекции;
- **неинфекционные (вегетативные)**, или незрелые фаги, находящиеся еще в стадии размножения.

В свою очередь инфекционные фаги разделяют на:

- **покоящиеся** – находящиеся вне клетки;
- **вирулентные** – способные вызвать продуктивную форму инфекции;
- **умеренные** фаги – способные вызывать не только продуктивную, но и редуцированную фаговую инфекцию. Среди умеренных фагов различают фаги с полноценным и дефектным геном.

Умеренные фаги характеризуются способностью существовать в состоянии **профага**, когда фаг вместо репликации обратимо взаимодействует с генетической системой клетки-хозяина, интегрируясь в хромосому или сохраняясь в виде плазмиды (вирусный геном реплицируется синхронно с ДНК хозяина и делением клетки). *В состоянии профага литические функции фага подавлены.*

Таким образом, типичный бактериофаг может существовать в трех состояниях: профага, вегетативного фага и зрелого фага.

По спектру действия на бактерии фаги подразделяются на:

- **поливалентные**, лизирующие бактерии нескольких видов;
- **монофаги**, лизирующие бактерии только одного вида;
- **типоспецифические фаги** (типовые, Т-фаги), которые избирательно лизируют отдельные варианты бактерий внутри вида. С помощью таких фагов производится наиболее тонкая дифференциация бактерий внутри вида, с разделением их на фаговарианты.

Строение вириона и организация генома бактериофагов

Геном фагов заключен в капсид, структурные субъединицы которого уложены по типу либо спиральной, либо кубической симметрии. Крупные фаги, имеющие хвостик, устроены по типу двойной симметрии (головка – икосаэдр, хвостик – спиральная симметрия).

Фаги различаются:

- *по размерам* – мелкие, среднего размера и крупные. К самым маленьким относятся фаги М13 и φХ174;
- *по форме* – нитевидные, сферические; фаги, имеющие головку и хвостик (рисунок 19).

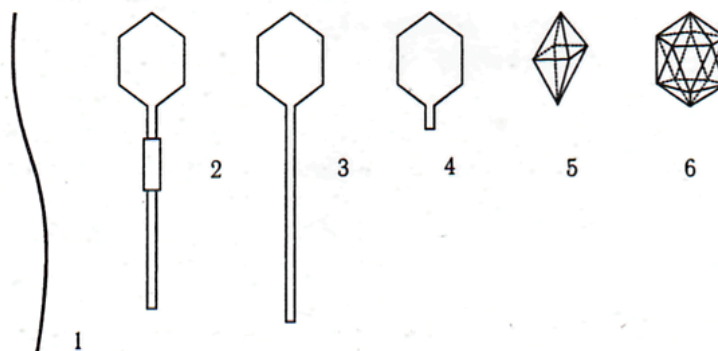


Рисунок 19 – Различные формы фаговых вирионов (по Г. Шлегелю, 1972):

1 – нитевидная форма (фаг fd); 2 – гексагональная головка с отростком и сократительным чехлом (фаги Т2, Т4, Т6); 3 – гексагональная головка с длинным, не способным к сокращению хвостиком; 4 – головка с коротким отростком (фаги Т3, Т7); 5 – октаэдр; 6 – икосаэдр

Морфологическая классификация бактериофагов:

I тип – нитевидные ДНК-содержащие фаги, лизируют бактерии, имеющие F-плазмиды;

II тип – фаги с аналогом отростка, мелкие РНК-содержащие фаги;

III тип – фаги с коротким отростком (Т3,Т7);

IV тип – фаги с несокращающимся чехлом отростка и двунитевой ДНК (Т1, Т5 и др.);

V тип – ДНК-содержащие фаги с сокращающимся чехлом отростка, заканчивающимся базальной пластинкой (Т2, Т4, Т6).

Фаг М13 – нитевидный, геном – однонитевая кольцевидная молекула ДНК с молекулярной массой 2 МД, содержит 8 генов. Оболочка состоит из 3000 белковых субъединиц, уложенных по спирали. Длина вириона 1000 нм, его диаметр 6 нм.

Фаг ϕ X174 – икосаэдр с молекулярной массой 6,2 МД, диаметр 25 нм. Геном – однонитевая кольцевидная молекула ДНК, состоящая из 5400 нуклеотидов, несет 9 генов.

Простые по строению головчатые и нитевидные фаги содержат одноцепочечную кольцевую ДНК, в которой находится по одному остатку метилцитозина (ϕ X174, f1 и fd), или одноцепочечную линейную РНК (MS-2 и f2). Наиболее сложно устроены крупные фаги, состоящие из головки и хвостика. Сперматоидной формы (двойной тип симметрии) фаги состоят из 40-50% спирально скрученной двухцепочечной ДНК, находящейся в полости головки фага, и 50-60% белка, из которого построены оболочка головки и отросток фага.

Фаг Т2 паразитирует у *E. coli* и имеет следующую структуру (рисунок 20).

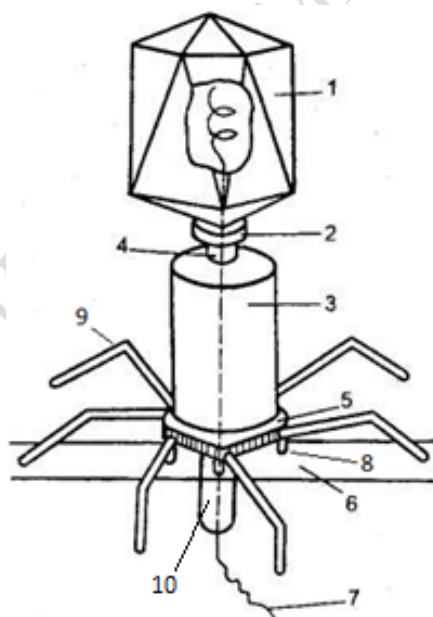


Рисунок 20 – Строение бактериофага Т2 (инъекция ДНК в бактерию):

1 – головка (капсид); 2 – «воротничок»; 3 – хвост (белковый чехол хвоста) нуклеиновая кислота; 4 – шейка; 5 – базальная пластинка; 6 – оболочка бактерии; 7 – фаговая ДНК; 8 – шип; 9 – фибрилла (ворсинка) хвоста; 10 – полый стержень

Фаг λ (лямбда) состоит из головки и хвостика. Его геном представлен двунитевой линейной ДНК, имеющей «липкие» концы (избыточные нуклеотидные последовательности на противоположных концах нитей, комплементарные друг другу), поэтому она может переходить в кольцевую структуру, необходи-

мую для ее включения в хромосому клетки-хозяина. ДНК фага λ , имеет молекулярную массу около 30 МД, содержит 46 500 нуклеотидных пар и несет 32 гена, 7 из которых кодируют головку, 11 – хвостик, а остальные играют регуляторную роль.

3.2 Жизненный цикл инфекционных фагов

Жизненный цикл фага может проявляться в форме:

- **продуктивной** инфекции – фаг размножается в клетке и выходит из нее;
- **редуктивной** инфекции – геном фага проникает в клетку, однако размножения фага не происходит, его геном интегрируется в хромосому клетки-хозяина, становится ее составной частью, т. е. фаг превращается в профаг;
- **абортивной** инфекции, при которой взаимодействие фага с клеткой обрывается на какой-то стадии жизненного цикла фага, и он погибает.

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 конверсией**. Лизогенную конверсию вызывают только умеренные фаги.

Стадии жизненного цикла вирулентного фага:

1) **адсорбция фагов** на клеточной поверхности бактерий при помощи специфических рецепторов (белков-лоцманов), которые располагаются на кончике нити, шипа или хвостика;

2) **проникновение** фагового генома через клеточную стенку и цитоплазматическую мембрану внутрь клетки и освобождение его от оболочки (**раздевание** фага);

3) **установление фагового генома** с помощью белка-лоцмана для реализации содержащейся в геноме информации;

1) **репликация** фаговой геномной ДНК или РНК;

2) **сборка** вновь синтезированных вирионов – заключение геномной нуклеиновой кислоты в белковую оболочку, морфогенез фагов;

3) **выход** вновь синтезированных фагов из клетки:

а) путем отпочковывания (M13 – единственный фаг, не вызывающий при выходе из клетки ее гибели);

б) путем лизиса клетки изнутри. Он осуществляется свободным лизоцимом и вызывает гибель клетки. Он синтезируется на самом последнем этапе размножения фага.

Иногда бывает 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.

Морфогенез мелких фагов протекает по типу самосборки. У крупных фагов этот процесс имеет 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. Точно так же ворсинки могут присоединяться к хвосту только после того, как он соединится с полностью готовой головкой. Благодаря строгому генетическому контролю со стороны фага обеспечивается последовательность и согласованность всех процессов его внутриклеточного размножения.

Стадии жизненного цикла умеренного фага:

- 1) *адсорбция* фага на поверхности клетки;
- 2) *проникновение* фаговой ДНК в бактериальную клетку;
- 3) *сайтспецифическая интеграция фаговой ДНК в хромосому клетки-хозяина* и превращение фага в профаг.

Механизм интеграции фаговой ДНК в хромосому бактериальной клетки лучше всего изучен на примере фага λ (лямбда). Фаг λ включается в хромосому *E. coli* между генами *gal* и *bio* с помощью сайт-специфической рекомбинации. Она оказывается возможной потому, что ДНК фага имеет особый участок – *attP* (от *англ.* attachment phage – прикрепление фага). Такой же участок имеется и в хромосоме *E. coli* – *attB*. Он расположен между генами *gal* и *bio*. Участки *att* имеют сложную структуру и состоят из 250 нуклеотидов. В результате рекомбинации между *attP* и *attB*, протекающей по механизму кроссинговера, фаговая ДНК оказывается включенной в хромосому, причем слева она фланкирована участком *attL* (от *англ.* left – левый), а справа – *attR* (от *англ.* right – правый), которые образуются вследствие рекомбинации между *attP* и *attB*. Рекомбинация протекает с участием генов *red* фага и *recA* – бактерии. Для интеграции требуется также белок фага – продукт гена *int* (интеграза) и особый хозяйский белок интеграции. Таким образом, геном фага, интегрируясь в хромосому, превращается в профаг, а клетка становится лизогенной. Выходу профага из хромосомы препятствует цитоплазматический репрессор, который наделяет клетку одновременно иммунитетом против повторного инфицирования данным фагом. Синтез репрессора контролируется фагом. Однако профаг спонтанно или под воздействием различных факторов (химические вещества, облучение УФ, рентгеновскими лучами, повышенная температура) может выходить из хромосомы клетки и вызывать продуктивную инфекцию, заканчивающуюся лизисом клетки и выходом из нее вновь синтезированных вирионов. Механизм выхода (исключение фага) из хромосомы состоит в том, что происходит рекомбинация между *attL* и *attR*, в результате которой восстанавливаются *attP* и *attB*, а фаговая ДНК принимает кольцевидную структуру и исключается из хромосомы. Процесс выхода требует участия, помимо указанных выше белков, еще одного белка – продукта фагового гена *xis* (ген эксцизии, исключения).

Связь профага с бактерией очень прочная и в естественных условиях нарушается с частотой 10^{-2} - 10^{-3} (*спонтанная продукция фага*). Частоту отщепления профага от бактериальной хромосомы можно увеличить, воздействуя на лизогенные бактерии ультрафиолетовыми лучами, ионизирующей радиацией и химическими мутагенами (индукция лизогенных бактерий).

Умеренные фаги играют важную роль в обмене генетическим материалом между бактериями. Этот процесс получил название трансдукции.

3.3 Выделение бактериофагов из окружающей среды, получение фаголизата, обнаружение (индикация) бактериофагов

Бактериофаги обнаруживаются во внешней среде (вода, почва, пищевые продукты), в выделениях людей и животных, в популяциях пораженных фагом бактерий. **Выделение бактериофагов** состоит из нескольких этапов. Вначале исследуемый материал освобождают от крупных частиц. Для этого применяют центрифугирование при 1-1,5 тыс. об/мин в течение 15-20 мин или фильтрацию через бумажный фильтр. Затем из фильтрата или центрифугата (надосадочной жидкости) удаляют бактерии, для чего пропускают их через бактериальные фильтры № 2 или № 3. От живых бактерий можно также освободиться обработкой материала прогреванием и 1-2-часовой экспозицией его при комнатной температуре с хлороформом (1-2 капли на 10 мл) и последующим центрифугированием. Надосадок или фильтрат испытывают на присутствие фага накапыванием на газоны культур чувствительных к нему бактерий или методом агаровых слоев. Для выделения фага лизогенные культуры выращивают в оптимальных условиях до фазы логарифмического роста, обрабатывают и исследуют, как указано выше.

Получение фаголизата, обнаружение бактериофагов. Фаги размножаются только за счет паразитирования в микробной клетке. Их размножение в бульонной культуре приводит к тому, что культура, бывшая перед добавлением фага мутной, через несколько часов инкубации при 37 °С становится прозрачной (рисунок 21). **Фаголизат** – продукт лизиса жидкой бактериальной культуры бактериофагом, представляющий собой смесь компонентов бактериальных клеток и питательной среды, содержащую частицы бактериофага.

Для получения «чистой линии» фага (свободной от примеси других фагов) проводят последовательные пассажи морфологически однотипных негативных колоний на газоне одного и того же бактериального штамма. Готовый препарат фага представляет собой прозрачную желтоватую жидкость. В промышленных условиях и в специализированных лабораториях в целях повышения стабильности фильтрат фага подвергают лиофильной сушке и таблетируют.



голизатов подвер-
сушке и таблетир-

Рисунок 21 – Литическое действие бактериофагов (справа – положительный результат)

На плотных средах фаги обнаруживают либо с помощью спот-теста, либо методом агаровых слоев, предложенным А. Грациа (1936) (рисунок 22).

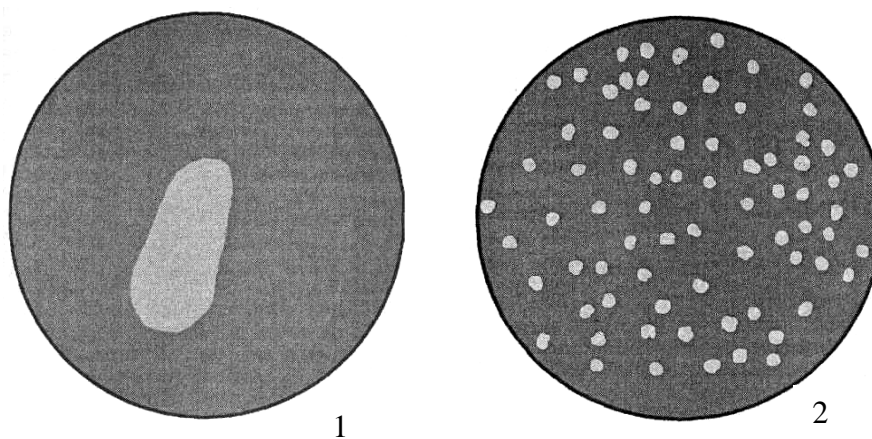


Рисунок 22 – Обнаружение бактериофагов в исследуемом материале:
1 – спот-тест; 2 – титрование по Грациа

Спот-тест. На поверхность агара в чашке засевают бактериальную культуру, а затем на нее наносят каплю содержащего фаг материала. Если в нем содержится много вирионов, то на месте нанесения капли будет большое стерильное пятно (*англ. spot - пятно*).

Метод агаровых слоев. Вначале в чашку наливают слой питательного агара. После застывания на этот слой добавляют 2 мл расплавленного и охлажденного до 45 °С 0,7%-ного агара, в который предварительно добавляют каплю концентрированной суспензии бактерий и определенный объем суспензии фага (фаголизата). После того, как верхний слой застынет, чашку помещают в термостат. Бактерии размножаются внутри мягкого слоя агара, образуя сплошной непрозрачный фон, на котором хорошо видны колонии фага в виде стерильных пятен. Каждая колония образуется за счет размножения одного исходного фагового вириона.

Вопросы для самоконтроля

- 1 Дайте определение понятиям «бактериофаги», «бактериофагия».

- 2 Дайте классификация бактериофагов по способности вызывать инфекцию и по спектру действия.
- 3 Назовите и охарактеризуйте три состояния фага.
- 4 Приведите морфологическую классификация бактериофагов.
- 5 Назовите примеры ДНК-содержащих фагов. Какое они имеют строение?
- 6 Нарисуйте схему строения фага T2 и назовите элементы его структуры.
- 7 Перечислите формы фаговой инфекции и дайте им определение.
- 8 Назовите стадии жизненного цикла вирулентных и умеренных фагов.
- 9 Покажите особенности морфогенезавирулентных фагов на примере фага T4.
- 10 Дайте определение понятиям «лизогения» и «лизогенная конверсия».
- 11 В чем заключается механизм сайт-специфической интеграции фага λ в хромосому бактериальной клетки.
- 12 Назовите направления практического использования бактериофагов.
- 13 Раскройте суть технологии выделения бактериофагов из окружающей среды, получения фаголизата и обнаружения фагов.

Лабораторное занятие 3

Вирулентные и умеренные фаги. Получение фаголизата и индикация бактериофагов

Цель занятия: Ознакомиться с методами выделения бактериофагов из окружающей среды, получения фаголизата и обнаружения (индикации) бактериофагов.

Материалы и оборудование: речная вода, бактериальные фильтры; вакуумная установка для фильтрования; бумажные фильтры; стеклянная воронка; чистая культура чувствительных к фагу бактерий и заведомо нечувствительная культура; термостат; МПА; стерильные чашки Петри и пробирки на 50 мл; бактериологическая петля; спиртовка; фотографии и таблицы с изображением бактериофагов.

Задание 1: проведите выделение бактериофагов из речной воды.

Задание 2: используя выделенные фаги получите фаголизат.

Задание 3: проведите учет результатов качественного определения бактериофага.

При выполнении указанных заданий используйте методику, описанную в пункте 3.3 данного пособия и указания в протоколе дневника лабораторных работ по вирусологии (протокол № 3).

Тема 4 Бактериофаги как переносчики генетической информации. Организация геномов и репродуктивные тип-варианты вирусов

4.1 Трансдукция. Лизогения и ее биологическое значение

4.2 РНК и ДНК как генетический материал вируса

4.3 Репродуктивные тип-варианты вирусов, взаимодействие между вирусами

4.1 Трансдукция. Лизогения и ее биологическое значение

Трансдукция – вид рекомбинации, при которой перенос генетического материала от одних клеток (доноров) к другим (реципиентам) осуществляют умеренные фаги или их мутанты.

Различают *общую* (генерализованную, или неспецифическую), *специфическую* (ограниченную) и *абортивную* трансдукцию.

Общая трансдукция. В процессе внутриклеточного размножения фага (рисунок 23) в его головку может быть случайно включен вместо фаговой ДНК фрагмент бактериальной ДНК, равный по длине фаговой – возникают дефектные вирионы. Такие фаги сохраняют инфекционные свойства. Они адсорбируются на бактериальной клетке, вводят в нее ДНК, содержащуюся в головке, но при этом размножения фага не происходит. Введенная в клетку реципиента донорная ДНК (фрагмент хромосомы донора), если она содержит гены, отсутствующие у реципиента, наделяет его новым признаком. В случае рекомбинации привнесенного фагом фрагмента ДНК донора с хромосомой клетки-реципиента этот признак наследственно закрепляется.

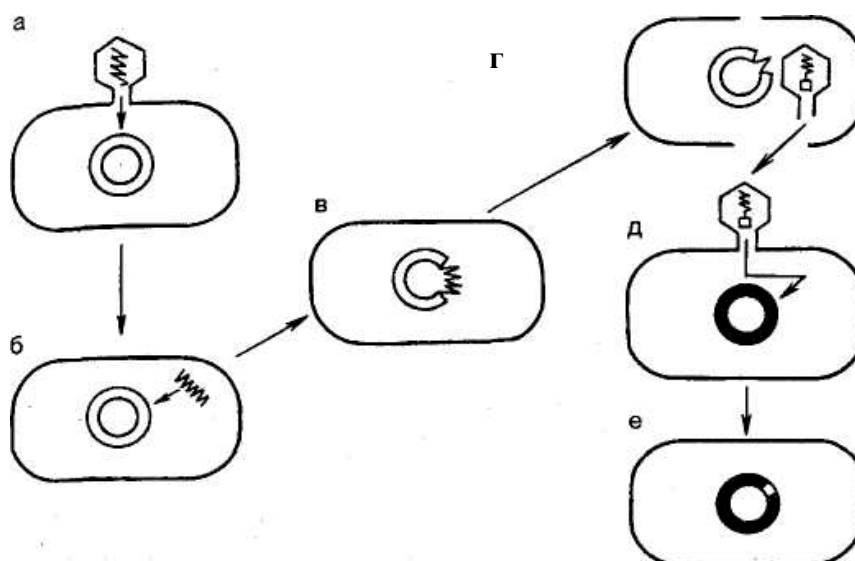


Рисунок 23 – Трансдукция:

a – 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

Специфическая трансдукция. Отличается от неспецифической тем, что в этом случае трансдуцирующие фаги всегда переносят только определенные гены. Специфическая трансдукция всегда связана с интеграцией умеренного фага в хромосому клетки-хозяина. При выходе (исключении) из хромосомы профага может захватить ген. Но в этом случае он должен лишиться такого же размера своей ДНК. Специфическую трансдукцию у *E. coli* осуществляет фаг лямбда и родственные ему лямбдоидные и другие фаги. Трансдуцирующий фаг в случае

инфицирования реципиентной клетки интегрируется в ее хромосому и привносит в нее новый ген (новый признак), опосредуя не только лизогенизацию, но и лизогенную конверсию.

Таким образом, *если при неспецифической трансдукции фаг является только пассивным переносчиком генетического материала, то при специфической фаг включает этот материал в свой геном и передает его, лизогенизируя бактерии, реципиенту.*

Лизогенная конверсия может произойти и в том случае, если геном умеренного фага содержит такие собственные гены, которые у клетки отсутствуют, но отвечают за синтез существенно важных белков.

С помощью трансдуцирующего фага могут передаваться многие признаки и свойства: способность сбраживать различные углеводы, синтезировать аминокислоты и витамины, резистентность к антибиотикам, вирулентность, токсигенность, жгутики. Трансдукция служит активным механизмом формирования культур с измененными свойствами и может играть большую роль в эволюции микробов.

Образующиеся рекомбинанты называются **трансдуктантами**. Приобретенные в процессе трансдукции признаки стабильны и передаются по наследству. Некоторые клоны-трансдуктанты могут оказаться неустойчивыми и в последующих пересевах теряют трансдуцированные им свойства.

Абортивная трансдукция. Отличается от первых двух тем, что перенесенный фагом фрагмент ДНК донора остается в цитоплазме реципиентной клетки в автономном состоянии (не включается в хромосому клетки-реципиента). Этот фрагмент ДНК в течение нескольких делений бактерий передается лишь одной клетке, а далее полностью исчезает. В течение этого времени автономные гены непосредственно или через свои продукты, остающиеся в клетках, детерминируют определенные признаки (способность синтезировать вещества, подвижность и пр.). Абортивная трансдукция встречается в 10 раз чаще генерализованной.

Явление фагоносительства – лизогении – было описано Д'Эреллем, который считал, что такие культуры загрязняются фагом извне. Подобные культуры были названы ложнолизогенными.

Ложнолизогенные культуры состоят из смеси устойчивых и чувствительных к определенному фагу клеток. Такие культуры могут быть легко освобождены от содержащихся в них фагов или путем нескольких пассажей, или с помощью специфической антифаговой сыворотки, или воздействием антифаговыми веществами.

Кроме ложнолизогенных, встречаются такие содержащие фаги культуры, у которых лизогенное состояние, т. е. способность выделять фаги, стойко сохраняется даже после многочисленных пассажей в среде с антифаговой сывороткой и многократных воздействий антифаговыми веществами. Такие культуры названы **истиннолизогенными** (далее будут называться «лизогенными»).

Лизогенными культурами являются такие культуры, которые обладают способностью продуцировать зрелые частицы фага без воздействия на них

фагом извне. Это свойство стойко передается по наследству. В лизогенной культуре фаг находится внутри клетки в виде профага.

Клетку можно экспериментально сделать лизогенной. Оказалось, что при воздействии на клетку умеренным фагом часть популяции клеток лизируется, а другая часть становится лизогенной.

Лизогенизация – превращение нелизогенных клеток бактерий в лизогенные при заражении их называемыми умеренными бактериофагами.

Частота лизогенизации – отношение числа лизогенизированных клеток к общему числу инфицированных клеток – зависит от температуры, состава питательной среды и др. причин и повышается с понижением уровня метаболизма бактерий; используется для характеристики умеренных фагов.

При лизогенизации происходит объединение генетического материала клетки с генетическим материалом фага на молекулярном уровне. Известны пока единичные случаи, когда профаг не связан с хромосомой, а расположен на мембранах клеточной цитоплазмы. Таким образом, профаг находится в клетке либо в интегрированном с бактериальной хромосомой состоянии (например, λ , P22), либо в виде цитоплазматической частицы, в частности, профаги P1 и N15 локализуются в цитоплазме клетки хозяина, образуя самостоятельный репликон, подобно плазмидам бактерий.

Лизогенные культуры устойчивы (или иммунны) к тому фагу, который они содержат, а также к близкородственным ему фагам. При размножении лизогенной культуры какая-то часть клеток популяции лизируется и освобождает зрелые частицы специфичного для этой популяции умеренного фага.

Образование лизогенными культурами зрелых частиц фага получило название **спонтанной индукции**. Количество лизируемых клеток и количество образовавшихся зрелых частиц фага зависят от особенностей данной культуры и условий выращивания. В то же время количество клеток, освобождающих фаги, может быть резко увеличено при воздействии на лизогенную культуру некоторыми физическими и химическими факторами, получившими название **индуцирующих факторов**. При индукции некоторых лизогенных культур удавалось вызывать образование зрелых частиц фага почти у всех клеток. К индуцирующим агентам относятся ультрафиолетовые (УФ), рентгеновские и гамма-излучения, перекиси, азотистый иприт и его гомологи, этиленмин, урацил, многие антибиотики. Наиболее эффективные и широко применяемые индуцирующие факторы – УФ-лучи и антибиотик митомицин С.

Как отмечалось, важным свойством лизогенной культуры является ее устойчивость к содержащемуся в ней фагу. В связи с этим выделение и изучение умеренных фагов лизогенной культуры возможно лишь в том случае, когда имеется другая культура того же вида, которая чувствительна к умеренному фагу данной лизогенной культуры. Такие культуры получили название **индикаторных культур**.

Лизогения широко распространена среди всех систематических групп микроорганизмов. Есть все основания утверждать, что абсолютное большинство микроорганизмов являются лизогенными. Ни про одну культуру нельзя с уверенностью сказать, что она не лизогенная.

За последнее время накапливается все больше данных о том, что многие лизогенные культуры содержат 2, 3, 4 и более умеренных фагов, т. е. являются полилизогенными. **Полилизогенные культуры** можно экспериментально получить с помощью воздействия на них одновременно или последовательно различными умеренными фагами.

Не исключено, что лизогенизация является одним из механизмов защиты микробной клетки от фаговой инфекции, выработанным клеткой в процессе длительной эволюции. Лизогенизация в известной степени биологически выгодна и клетке, и фагу. Клетка при лизогенизации становится устойчивой не только к данному фагу, но и к родственным ему фагам и, кроме того, приобретает дополнительные свойства.

Фаг же приобретает устойчивость к разнообразным внешним воздействиям и в то же время сохраняет потенциальную возможность перейти в вегетативное состояние и в состояние зрелой инфекционной частицы. Широкое распространение лизогении дает основание рассматривать это явление не как исключительное, а как нормальное на данном этапе эволюции микробов.

На основе ДНК бактериофагов сконструированы несколько типов молекулярных векторов. Векторы внедрения имеют в своем составе один сайт встраивания фрагмента чужеродной ДНК. Векторы замещения имеют два или более мест встраивания экзогенных фрагментов ДНК за счет замещения фрагментов векторной фаговой ДНК.

Космиды – это плазмидные векторы, в которые встроен участок генома фага λ (cos-сайт), обеспечивающий возможность упаковки этой молекулы ДНК в фаговую частицу *in vitro*. Созданы клонирующие векторы на основе геномов нитевидных фагов (M13, fd, f1).

Фазмиды – это молекулярные векторы, которые являются искусственными гибридами между фагом и плазмидой. В их составе обнаруживаются фрагменты ДНК бактериофага λ , содержащие все гены, необходимые для литической инфекции, а также плазмидная ДНК. Гены репликации как фага, так и плазмиды в фазмидах сохранены. Перед инфекцией клеток бактерий фазмидные ДНК упаковываются *in vitro* в капсидные белки фага λ . Попадая в клетки, фазмида реплицируется с использованием областей фага λ , в результате чего на газоне чувствительных бактерий образуются негативные колонии. Если же присутствует ген, кодирующий синтез репрессора фага λ , то фазмида реплицируется как плазида. Кроме того, если ген-репрессор кодирует дефектный белок cI, инактивирующийся при повышенной температуре (температурочувствительный репрессор), то фазмида реплицируется как плазида при низкой температуре или как бактериофаг при повышенной.

При выполнении лабораторной работы используется фазмида λ pSL5. Она представляет собой вектор замещения и позволяет клонировать фрагменты ДНК размером 7-22 тыс. пар нуклеотидов. Плазмидный репликон обеспечивает репликацию ДНК фазмиды при пермиссивной (разрешающей) температуре (28-30 °C) и резистентность клеток к ампициллину (Amp). В условиях роста при непермиссивной температуре (37-42 °C) происходит инактивация термочувствительного репрессора фага λ (cIts) и начинается цикл вегетативного развития

фага, что приводит к лизису клеток и высвобождению фазмид в окружающую среду. Следовательно, в клетках бактерий при перmissive температуре фазмида ведет себя как плаزمид, при неpermissive – как бактериофаг.

Техника лизогенизации бактерий *E. coli*

Ночную культуру бактерий *E. coli* TG1 заражают фазмидными частицами и инкубируют при 28 °С. Для этого в пробирку вносят 1 мл ночной культуры бактерий (штамм *E. coli* TG1) и 0,1 мл фазмиды. Пробирки инкубируют 1 час при 30 °С. После этого культуру разводят до 10^{-1} – 10^{-2} и из каждого разведения, а также из не разведенной культуры по 0,1 мл высевают на селективную среду: ПА (полноценный агар) с ампициллином (100 мкг/мл) и инкубируют 48 ч при 28 °С.

Выросшие колонии рассеивают на 2 параллельные чашки, которые инкубируют соответственно при 28 °С и 37 °С. Для этого дно чашки с наружной стороны маркером делят на 8 секторов, которые нумеруют цифрами от 1 до 8. На одной чашке ставят цифру 28, на другой – 37 (температура инкубирования, соответственно). Бактерии из одной колонии петлей засевают в один и тот же номер сектора на чашках, обозначенных 28 и 37. Чашки помещают в термостат на соответствующую температуру на 48 часов. Если бактерии были лизогенизированы (наследовали фазмиду), то их рост при 28 °С выражен лучше, так как при 37 °С будет происходить индукция фага λ , приводящая к гибели клеток.

Индукция лизогенных бактерий ультрафиолетовыми лучами. Свежевыросшую 8-часовую культуру бактерий разводят 1:20-1:30 вероналовым буфером и по 5 мл разливают в две чашки Петри. Одну из них (опытную) открывают и в течение 30-180 с облучают под бактерицидной лампой БУВ, а вторую (контрольную) - выдерживают в зоне действия УФ-лучей закрытой. Затем обе взвеси бактерий (3-3,5 мл) засевают в две пробирки с 5 мл соответствующей питательной среды и после нескольких часов инкубации в термостате в облученном посеве обнаруживают литический эффект действия вегетативных фагов.

4.2 РНК и ДНК как генетический материал вируса

Типы вирусных геномов. Вирусная нуклеиновая кислота представлена только одной нуклеиновой кислотой (ДНК или РНК). Каждая из них является геномом. В разных по величине вирионах в геноме насчитывают от нескольких до многих десятков генов. Геном вируса является гаплоидным [греч. *Haploos*, одиночный и *eidos*, вид], т. е. представлен одним набором генов. Частично диплоидны [греч. *Diploos*, двойной] ДНК-содержащие вирусы, в ДНК которых встречаются повторяющиеся нуклеотидные последовательности. Полностью диплоидны ретровирусы, геном которых представлен двумя идентичными молекулами РНК.

Особенности строения вирусной ДНК. Вирусные ДНК по структуре могут быть: 1) цельными одноцепочечными; 2) двухцепочечными; 3) с «разрыв-дефектом» в одной цепи.

По форме молекула ДНК может быть: 1) линейной, 2) кольцевой (циркулярно-замкнутой), 3) ковалентно-сцепленные суперспирализованные (например, у паповавирусов).

В вирусной ДНК на концах молекулы имеются прямые или инвертированные (развернутые на 180°) повторяющиеся нуклеотидные последовательности. Их наличие обеспечивает способность молекулы ДНК замыкаться в кольцо.

Молекулярная масса вирусных ДНК в 10-100 раз меньше массы бактериальных ДНК.

Особенности строения вирусной РНК. Молекулы РНК по структуре могут быть: 1) одно- и двухцепочечные (диплоидный геном); 2) цельные (сплошные) и фрагментированные (сегментированные) на 2–3 ... 8–12 сегментов. Наличие сегментов ведет к увеличению кодирующей ёмкости генома.

По форме РНК различают: 1) линейные, 2) кольцевые.

Среди РНК-геномных вирусов с одноцепочечной линейной молекулой РНК различают вирусы с *+РНК (позитивным)* и *-РНК (негативным) геномом*.

+РНК выполняет и геномную и информационную функции, т. е. одновременно служит матрицей для синтеза вновь образующихся вирионных РНК и белков. Плюс-нити РНК имеют характерные окончания («шапочки») для распознавания рибосом.

-РНК не способны транслировать генетическую информацию непосредственно на рибосомах, то есть они не могут функционировать как иРНК. Синтез иРНК у РНК-негативных вирусов осуществляется в зараженной клетке на матрице *-РНК* с помощью вирусоспецифического фермента *транскриптазы*.

Некоторые РНК-геномные вирусы могут содержать как «+», так и «-» нити РНК (\pm РНК). Такие вирусы называют *амбисенсвирусами*.

Структурно-функциональная организация вирусного генома. ДНК-содержащие вирусы имеют структурные гены, кодирующие белки-ферменты, и регуляторные гены, детерминирующие образование репрессоров, подавляющих, в частности, функцию структурных.

Считывание информации с *оперонов* контролируется *энхансером* [англ. *enhancer*] или усилителем транскрипции; *промотором* [лат. *promotum*, продвигать], ответственным за ее инициацию (начало), с которым связывается фермент РНК-полимераза, осуществляющая транскрипцию ДНК; *оператором* [от лат. работник], регулирующим транскрипцию оперона (или отдельных генов) и *терминатором* [лат. *terminare*, ограничивать], прекращающим ее. При этом регуляторные участки оперона представляют собой короткие последовательности нуклеотидов ДНК; энхансер, промотор и оператор расположены в его начале (перед структурными генами), а терминатор – в конце.

В *структурных генах* вирусных оперонов, как и в клетках эукариот, имеются *кодируемые участки* нуклеотидных последовательностей, несущих информацию (*экзоны*), и *некодируемые вставочные последовательности (интроны)*, которые после транскрипции в процессе созревания (процессинга) иРНК вырезаются с одновременным считыванием экзонов, что называется сплайсингом [англ. *splice*, соединять, сращивать].

Кодирующая способность вирусного генома. Число генов в вирусных геномах колеблется от 3–4 у самых простых вирусов до многих десятков у сложно устроенных. Увеличение генетической информации при минимальном содержании генетического материала происходит за счет того, что:

1) вирусные иРНК в отличие от иРНК про- и эукариот могут направлять синтез не одного, а двух-трех белков. Достигается это двухкратным считыванием одной и той же иРНК с находящихся в ней в разных участках двух-трех иницирующих АУГ-кодонов. Образующиеся полипептиды с разных иницирующих кодонов будут копиями, отличающимися только длиной;

2) при сдвиге рамки считывания на один или два нуклеотида и появлении нового генетического кода молекула иРНК может транслироваться с образованием таких полипептидов, у которых нет идентичных аминокислотных последовательностей. Такие белки называют *уникальными белками*;

3) нередко у вирусов происходит трансляция гигантских полипептидов-предшественников с последующим нарезанием их на более мелкие;

4) относительно невысокий уровень генетической информации вирусов компенсируется исключительно точным механизмом переключения с репликации на транскрипцию и наоборот, что особенно ярко проявляется при репродукции РНК-содержащих вирусов.

4.3 Репродуктивные тип-варианты вирусов, взаимодействие между вирусами

Наряду с полными вирионами в процессе репродукции формируются необычные по структуре и функции вирусные частицы, которые можно объединить в три группы: псевдовirusы, вирусы-мутанты и вирусы-рекомбинанты. Псевдо- и мутантные вирионы возникают в чистых и смешанных культурах вирусов, а рекомбинантные – только в смешанных.

Псевдовirusы представлены вирусными капсидами. Среди псевдовirusов различают:

– *неполные псевдовirusионы (вирусы-пустышки, или «вирусные тени»)* – полые капсиды, не содержащие вирусного генома;

– *псевдовirusионы*, капсиды которых вместо вирусного генома содержат нуклеиновую кислоту клетки-хозяина.

Типы вирусных мутантов. В репродуктивных циклах вирусов закономерно появляются вирусные *гибриды-мутанты* [лат. *mutation*, изменение], по структуре и фенотипу отличающиеся от родительского (дикого) типа, но имеющие его генетическую основу, и *немутационные гибриды*.

Термин «*мутант*» («тип», «штамм», «вариант») обозначает вирус, который отличается каким-то наследуемым признаком от родительского «дикого» вируса. «*Дикий тип*» – это условное обозначение определенной популяции, которое обычно применяют к ней только в связи с исследуемой мутацией, например температуростойчивость. При этом дикий тип может содержать иные мутации.

Различают спонтанную и индуцированную мутации вирусов.

Индукцированная мутация. Большая часть мутантов получена из популяций дикого типа, обработанных мутагенами, например, азотистой кислотой, гидроксиламином, алкилирующими агентами, ультрафиолетовым облучением.

Спонтанная мутация. Некоторые вирусы дают значительную долю мутантов при пассировании в отсутствие каких-либо мутагенов. Эти спонтанные

мутации накапливаются в геномах вирусов и приводят к изменению фенотипа. В основе спонтанного мутагенеза лежит «ошибочное» спаривание азотистых оснований, обусловленное существованием двух таутомерных [греч. *tauto* – те же самые, *meros* – часть] форм азотистых оснований. Во время репликации вирусов спаривание правильного азотистого основания с основанием в таутомерной форме приводит к простой замене (*транзиции*) пурина на пурин или пиримидина на пиримидин.

Появляющиеся мутанты, как правило, являются делеционными (лат. *deletion*, выпадение), т. е. утрачивающими определенный участок генома родительского вируса. Вирусные частицы с таким дефектным геномом сохраняют свою активность, но для репликации и созревания нуждаются в продуктах вирусного генома родителя – обычно в структурных и неструктурных белках. Такой характер воспроизводства вирусов называют *негенетическим типом взаимодействия* или *односторонней комплементацией* (дополнением); родительский вирус, стимулирующий репродукцию мутанта, – *вирусом-помощником*, а репродуцирующийся с его помощью мутант – *вирусом-сателлитом* (*спутником*).

В соответствии с этим различают 4 класса вирусов-мутантов: 1) вирусы с условно дефектными геномами; 2) ДИ-частицы, т. е. дефектные интерферирующие; 3) интеграционные вирусы с дефектными геномами; 4) вирусы-сателлиты.

Условно-дефектные вирусы несут мутантные геномы, дефектные в определенных условиях. Среди них чаще всего встречаются температурочувствительные *ts*- и холодоочувствительные *tc*-мутанты, мутанты по спектру хозяев и мутанты по морфологии бляшек.

У *ts*-мутантов нуклеотидная последовательность в геноме изменяется таким образом, что образованный ими белковый продукт сохраняет функционально активную конформацию только при перmissive [англ. *permissive*, разрешающий] температуре около 36-38°C, а при более высокой неpermissive температуре 39-42°C мутант становится нежизнеспособным и прекращает развитие. Наоборот, *tc*-мутанты размножаются при более высокой, чем оптимальная, permissive для них температуре.

Дефектные интерферирующие вирусы, или ДИ-частицы, представляют собой вирионы, у которых отсутствует некоторая часть геномной РНК или ДНК, но структурные белки остаются такими же, как у родительских вирусов. Репликация ДИ-частиц без родительских вирионов не происходит, но при совместном заражении клеток теми и другими она восстанавливается вследствие использования генных продуктов дикого типа, которых они сами не вырабатывают. Для ДИ-частиц родительский вирус с полноценным геномом является вирусом-помощником (*хелпером*). Название ДИ-частиц обусловлено тем, что утилизируя для своей репликации продукты генов хелпера, они вместе с тем угнетают репродукцию вируса-помощника, что в вирусологии называют *интерференцией* [лат. *inter*, взаимно и *ferio*, подавлять].

Интеграционные вирусы с дефектным геномом – это мутанты-типы (или виды) ретровирусов подсемейства *онкорнавирусов*, содержащие *onc*-гены [греч.

oncota, опухоль и англ. RNA – РНК], – прежде всего саркомные вирусы-гибриды, которые в процессе эволюции, как предполагают, приобрели клеточные *onc-гены*. Интегрируя с клеточным геномом, ДНК-транскрипты саркомных вирусов привносят в него *onc-гены* и, если они попадают под действие определенной регуляции клеток, после короткого латентного периода вызывают злокачественное их перерождение.

Вирусы-сателлиты. Так же, как ДИ-частицы, они паразитируют на генных продуктах вируссов-помощников и часто интерферируют с ними, как, например, сателлит вируса некроза табака, полностью зависящий в своей репликации от одновременного заражения клеток табака его инфекционным вирусом-помощником.

Однако вирусы-сателлиты часто используют генные продукты неродственных им вируссов-помощников с негомологичными геномами.

Генетическое взаимодействие между вирусами. Различают два типа генетического взаимодействия между вирусами: комплементация и рекомбинация.

Комплементацией называют взаимодействие генных продуктов вируса в смешанных вирусных культурах клеток, которое приводит к увеличению выхода одного или обоих вирусов, в то время как их генотип остается неизменным.

Существует два типа комплементации:

1) *неаллельная*, или межгенная (наиболее типичная), при которой мутанты, дефектные по различным функциям, помогают друг другу в репликации, предоставляя функцию, дефектную у другого вируса;

2) *аллельная*, или внутригенная (наблюдается намного реже), которая происходит в том случае, если генный продукт, дефектный у обоих партнеров в разных доменах, образует мультимерный белок. Если такой белок состоит из субъединиц одного партнера, то он функционально неактивен, а если из субъединиц обоих партнеров, то он может принять функционально активную конформацию.

Вирусной рекомбинацией называют обмен генетическим материалом (отдельных участков и целых генов) между двумя вирусами с разными геномами или же вариантами одного и того же вируса, различающимися некоторыми структурными особенностями их генома. Вирус, в геноме которого при рекомбинациях произошло замещение-добавление определенного участка ДНК, называют *вирусом-реципиентом (рекомбинантом)*.

Биологическое значение рекомбинаций: они не нарушают структуры вирусного генома (в отличие от мутаций, они не летальны), а обновляют его или устраняют имеющиеся повреждения, обогащают при этом генетический фонд вирусов и вносят существенный вклад в их эволюцию.

Внутримолекулярные рекомбинации у вирусов реализуются механизмом разрыв-воссоединение, а у РНК-вирусов с сегментированным геномом – перемешиванием генов.

Среди генетических рекомбинаций ДНК-вирусов выделяют рекомбинации:

1) *между двумя дикими типами вирусов с интактными* (лат. *intactus*, нетронутый), т. е. полными, *генами*. Рекомбинации между дикими типами могут быть межгенными с передачей генов и внутригенными с обменом отдельных участков гена. При этом образующийся *вирус-рекомбинант* наследует свойства обоих типов вирусов;

2) *между диким типом и его мутантным вариантом*. Формирование рекомбинантов происходит на основе мутантов. В частности, рекомбинация между интактным геномом дикого типа и дефектным геномом его мутанта устраняет повреждение в результате скрещивания полного и дефектного геномов вирусов – перекрестная, или кросс-реактивация. Так как при этом восстанавливается утраченный признак (маркер), то ее нередко именуют *феноменом «спасения маркера»*;

3) *между вариантами мутантов дикого типа вируса*. Формирование рекомбинантов происходит на основе мутантов. Также наблюдается реактивация повреждений геномов, но так как ее эффективность всецело зависит от количества и тесного кооперативного взаимодействия между рекомбинирующими вирусами, то ее называют не перекрестной, а *множественной реактивацией*.

В рекомбинационном процессе между вирусами, имеющими полный сегментированный геном, происходит перетасовка (пересортировка) их фрагментов и образование рекомбинантов, содержащих родственные, но не свойственные для дикого типа гены, например, гены гемагглютининов и нейраминидаз других сероваров вируса гриппа типа А.

Таким образом, в клетке, зараженной *смешанной культурой* родственных вирусов с интактными генами, возникают вирусы-рекомбинанты и реассортанты, а при одновременном ее инфицировании диким типом с его мутантом или несколькими мутантами-реактивантами.

Генетического взаимодействия между биологически и эволюционно далекими вирусами в природе не происходит вследствие их высокой специфичности по спектру клеток-хозяев и интерференции, т. е. *в естественных условиях из гетерогенных вирусных геномов гибридов не возникает*.

Негенетическое взаимодействие вирусов. Негенетические взаимодействия часто приводят к фенотипическому маскированию истинного вирусного генотипа и возникновению *немутационных гибридов*. К негенетическим взаимодействиям вирусов в частности относят *гетерозиготность, фенотипическое смешивание, интерференцию*.

Среди немутационных вирусов-гибридов различают вирусы-гетерозиготы и «вирусы-химеры».

Вирусы гетерозиготы (греч. *heteros*, иной, чужой и *zygoo*, соединять) представляют собой вирусные частицы, в состав которых входит не один, а два различных генома вирусов или один полный с некоторой частью второго. Образование гетерозигот сравнительно редкое явление.

«*Вирусы-химеры*» – это вирусные частицы, содержащие полный геном, заключенный в капсид, состоящий из белка другого вируса, что происходит при так называемом фенотипическом смешивании, или *транскарпсидизации*. Фенотипическое смешивание довольно широко распространено среди близкород-

ственных безоболочечных вирусов, таких, например, как вирусы полиомиелита типов 1 и 2, вирусов ЭКХО и Коксаки, других пикорнавирусов.

Таким образом, немутационные вирусы-гибриды – полноценные вирионы. Подобно вирусам-мутантам, возникают путем комплементации, а не вследствие скрещивания геномов, как рекомбинанты.

Состояния гетерозиготности и транскапсидизации вирусов неустойчивы и быстро исчезают при пассажах.

Биологическое значение немутационных гибридов: значение гетерозигот не выяснено. Транскапсидизация же может обеспечить вирусам-гибридам широкий круг хозяев и преодоление межвидовых барьеров.

Вопросы для самоконтроля

1. Дайте определение понятиям «трансдукция».
2. Чем отличаются друг от друга общая, специфическая и abortивная трансдукции?
3. Какие бактериальные культуры называют ложно- и истиннолизогенными?
4. Дайте определение понятиям «лизогенизация», «частота лизогенизации», «спонтанная индукция», «индуцирующие факторы», «индикаторные культуры», «полилизогенные культуры».
5. Какие структурные особенности имеют РНК и ДНК вирусного происхождения?
6. Какова структурно-функциональная организация вирусного генома?
7. Что определяет кодирующую способность вирусного генома?
8. Какие типы вирусных мутантов различают?
9. Что собой представляют ДИ-частицы?

Лабораторное занятие 4

Бактериофаги как переносчики генетической информации.

Организация геномов и репродуктивные тип-варианты вирусов

Цель занятия: Познакомиться с методологией лизогенизации бактерий и выявления лизогенных штаммов. Изучить особенности организации вирусных геномов, разнообразие репродуктивных тип-вариантов вирусов и формы взаимодействия между вирусами.

Материалы: демонстрационные таблицы (рисунки) со схемами процесса трансдукции; чистая культура *E. coli*; фазмида λ pSL5; стерильная селективная среда: ПА (полноценный агар) с ампициллином (100 мкг/мл); вероналовый буфер; стерильные пробирки на 20 мл, стерильные чашки Петри пипетка Пастера; бактериологическая петля; спиртовка; автоматический дозатор; бактерицидная лампа БУВ.

Задание 1: изучите методологию лизогенизации бактерий. Проведите учет результатов лизогенизации культуры *E. coli* на демонстрационном материале.

Задание 2: изучите результаты индукции лизогенных бактерий ультрафиолетовыми лучами на демонстрационном материале. Дайте объяснение полученным результатам.

Задание 3: проведите анализ особенностей строения вирусного генома.

Задание 4: проведите анализ механизмов образования репродуктивных тип-по-вариантов вирусов.

Задание 5: изучите общие принципы выражения генома при репродукции вирусов.

При выполнении указанных заданий используйте методику, описанную в пункте 4.1 данного пособия и указания в протоколе дневника лабораторных работ по вирусологии (протокол № 4).

Тема 5 Взаимодействие вирусов с клеткой – хозяином



5.1 Формы взаимодействия вирусов с клеткой

5.2 Формы продуктивности инфекции

5.3 Стадии репликации вирусов

5.1 Формы взаимодействия вирусов с клеткой

Репродукцией (лат. *production*, производство) вирусов называют процесс размножения вирусных частиц в чувствительных к ним клетках. Репродуцируются в них не все вирусы, а только вирулентные, обладающие высокой степенью патогенности. У интеграционных вирусов способность к репродукции возникает после исключения (отщепления) их генома от генома клеток.

Вирусы не способны к самостоятельному размножению. Синтез вирусных белков и воспроизведение копий вирусного генома обеспечивают биосинтетические процессы клетки-хозяина. Для вирусов характерен *дизъюнктивный* (разобщённый) *тип репродукции*, осуществляемый при взаимодействии вируса с инфицируемой клеткой – белковые макромолекулы и нуклеиновые кислоты образуются отдельно, после чего происходит сборка дочерних популяций. Реализация репродуктивного цикла в существенной степени зависит от типа инфицирования клетки и характера взаимодействия вируса с чувствительной (могущей быть инфицированной) клеткой.

Известны следующие типы взаимодействий «вирус-клетка»: продуктивный (образуется дочерняя популяция), интегративный (виrogenия), абортивный (дочерняя популяция не образуется) и интерференция вирусов (инфицирование чувствительной клетки разными вирусами).

Продуктивное взаимодействие «вирус – клетка» чаще носит *литический характер*, то есть заканчивается гибелью и лизисом инфицированной клетки, что происходит после полной сборки дочерней популяции. Гибель клетки вызывают следующие факторы: раннее подавление синтеза клеточных белков, накопление токсических и повреждающих клетку вирусных компонентов, повреждение лизосом и высвобождение их ферментов в цитоплазму.

Интегративное взаимодействие, или *виrogenия*, не приводит к гибели клетки. Нуклеиновая кислота вируса встраивается в геном клетки-хозяина и в последующем функционирует как его составная часть. Наиболее яркие приме-

ры подобного взаимодействия – лизогения бактерий и вирусная трансформация клеток.

Абортивное взаимодействие не приводит к появлению дочерней популяции и происходит при взаимодействии вируса с покоящейся клеткой (стадия клеточного цикла G₀) либо при инфицировании клетки вирусом с изменёнными (дефектными) свойствами. Следует различать *дефектные вирусы* и *дефектные вирионы*. Первые существуют как самостоятельные виды и функционально неполноценны, так как для их репликации необходим «вирус-помощник» (например, для репликации аденоассоциированного вируса необходимо присутствие аденовирусов). Вторые составляют дефектную группу, формирующуюся при образовании больших дочерних популяций (например, могут образовываться пустые капсиды либо безоболочечные нуклеокапсиды). Особая форма дефектных вирионов – *псевдовирионы*, включившие в капсид нуклеиновую кислоту клетки-хозяина.

Интерференция вирусов происходит при инфицировании клетки двумя вирусами. Различают гомологичную (при инфицировании клетки родственными вирусами) и гетерологичную (если интерферируют неродственные виды) интерференцию. Это явление возникает не при всякой комбинации возбудителей, иногда два разных вируса могут репродуцироваться одновременно (например, вирусы кори и полиомиелита).

5.2 Формы продуктивности инфекции

По характеру взаимодействия генома вируса с геномом клетки выделяют *автономное* (геном вируса не интегрирован в геном клетки) и *интеграционное* (геном вируса интегрирован в геном клетки) *инфицирование*. Особую форму составляют латентное и персистирующее инфицирование.

Латентное инфицирование. ДНК некоторых вирусов (герпесвирусы, ретровирусы) может находиться в клетке вне хромосом, либо вирусная ДНК интегрируется в ядерный геном, но вирусспецифические синтезы не происходят. Такая вирусная ДНК образует латентный *провирус*, реплицирующийся вместе с хромосомой. Подобные состояния вирусной ДНК нестабильны, возможны периодические реактивации с переходом в продуктивное взаимодействие «вирус – клетка», либо клетка трансформируется, давая начало злокачественному росту.

Персистирующее инфицирование. Некоторые РНК-вирусы могут вызывать персистирующие инфекции. При этом происходит постепенное выделение вирусных частиц, но инфицированная клетка не лизируется. Нередко дочерние популяции вирионов дефектны. Иногда такие хронические поражения у человека протекают без клинических проявлений. В частности, вирус гепатита В способен вызывать персистирующее поражение гепатоцитов с развитием хронического гепатита.

5.3 Стадии репликации вирусов

В цикле репродукции вирусов различают четыре стадии: 1) *подготовительную*, или инициальную, включающую фазы адсорбции вируса на клет-

ке, проникновения и раздевания в клетке; 2) собственно репродуктивную стадию образования структурных белков и вирионных нуклеиновых кислот; 3) сборку вирионов; 4) заключительную, сопровождающуюся выходом зрелых вирусных частиц из клетки (рисунок 24).

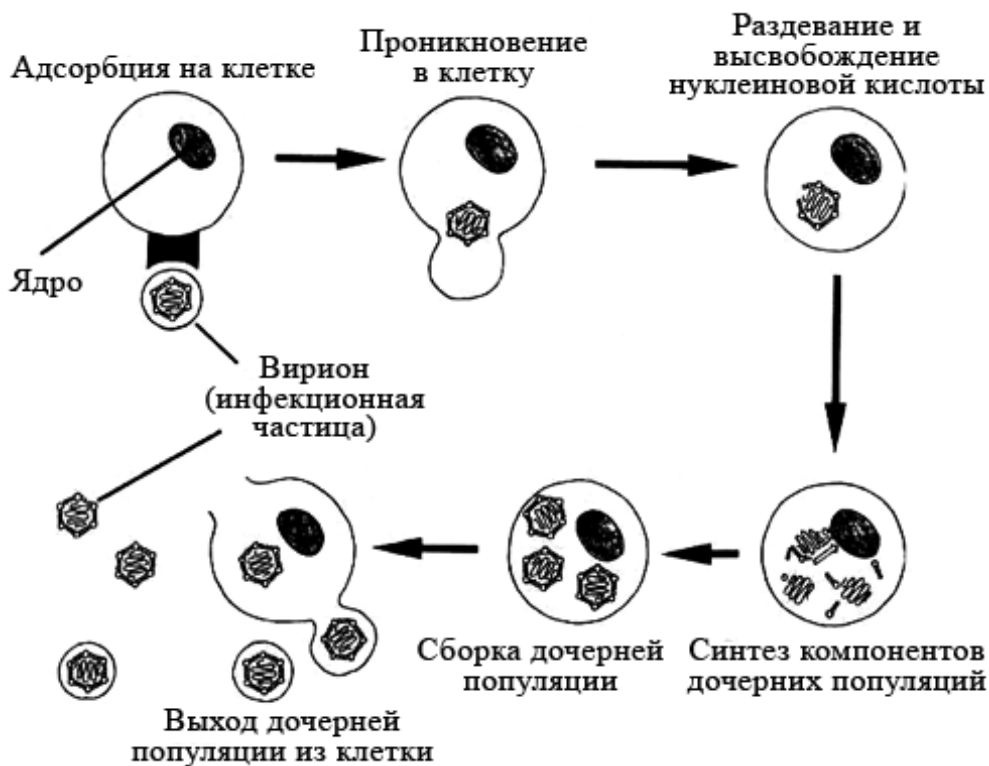


Рисунок 24 – Основные этапы репродукции вирусов

Адсорбция. Первая стадия репродуктивного цикла – адсорбция вириона на поверхности инфицируемой клетки. Адсорбция происходит путём взаимодействия вириона со специфическими клеточными рецепторами. Понятие «тропизм вирусов» объясняется специфическим взаимодействием вирусных белков с поверхностными рецепторами инфицируемой клетки.

Процесс адсорбции протекает в две фазы: фаза ионного притяжения обусловлена неспецифическим взаимодействием, фаза прикрепления происходит благодаря структурной гомологии либо комплементарности взаимодействующих молекул.

Количество инфекционных вирусных частиц, адсорбированных на клетке, определяет термин «множественность заражения» (инфицирования), то есть на клетке может сорбироваться большое количество вирионов. Однако, инфицированная вирусом клетка обычно толерантна к повторному заражению гомологичным вирусом.

Проникновение и «раздевание». «Голые» вирусы проникают в клетку путём эндоцитоза (*виропексис* [вирус + греч. *rexis*, прикрепление]) – погружения участка клеточной мембраны в месте их адсорбции. «Одетые» вирусы проникают в клетку путём слияния суперкапсида с клеточной мембраной при участии специфических F-белков (белков слияния). При проникновении «голых» вирусов

в клетку образуются вакуоли (эндосомы). После проникновения «одетых» вирусов в цитоплазму происходит частичная депротеинизация вирионов и модификация их нуклеопротеида (*раздевание*). Модифицированные частицы теряют инфекционные свойства.

Теневая фаза. После депротеинизации вирусы невозможно выделить из культуры клеток. Этот этап репродукции известен как теневая фаза, или **фаза эклипса** [от англ. *eclipse*, затмение]. Она включает репликацию нуклеиновых кислот вируса и синтез вирусных белков. Теневая фаза не происходит при температуре 0–4 °С (исключая вирус гриппа). Теневая фаза заканчивается после образования составных компонентов вируса, необходимых для сборки дочерних популяций.

Сборка. У просто устроенных вирусов, состоящих из нуклеиновой кислоты и нескольких белков, сборка состоит из упорядоченного взаимодействия этих молекул. У сложно устроенных вирусов сборка дочерних популяций протекает многоступенчато. Взаимодействие нуклеиновых кислот с внутренними и оболочечными белками приводит к образованию нуклеокапсидов. В процессе образования «одетых» вирусов полные нуклеокапсиды упорядоченно выстраиваются с внутренней стороны клеточной мембраны под участками, модифицированными оболочечными вирусными белками (М-белками).

Высвобождение дочерних вирионов. Вирусы, лишённые суперкапсида, и поксвирусы обычно высвобождаются быстро; выход дочерних популяций сопровождается разрушением цитоплазматической мембраны и лизисом клетки. Вирусы, содержащие суперкапсид, высвобождаются медленнее. Модифицированные участки мембраны с заключёнными в них вирионами выпячиваются наружу и затем отпочковываются. При высвобождении почкованием изменённая клетка иногда может сохранять жизнеспособность.

Вопросы для самоконтроля

- 1 Какие формы взаимодействия вирусов с клеткой различают?
- 2 Какие формы продуктивности инфекции существуют?
- 3 Назовите стадии репликации вирусов?
- 4 Охарактеризуйте начальную стадию репликации.
- 5 Каким способом вирусы могут проникать в клетку хозяина и от чего это зависит?
- 6 Как происходит синтез структурных элементов вириона?
- 7 Почему одну из фаз репликации вирусов называют «теневой фазой»?
- 8 Как происходит высвобождение дочерних популяций простых и сложных вирусов?

Лабораторное занятие 5 Взаимодействие вирусов с клеткой-хозяином

Цель занятия: Изучить формы взаимодействия вирусов с клеткой-хозяином и формы продуктивности вирусной инфекции.

Материалы: 1) электронные микрофотографии разных стадий репродукции простых и сложных вирусов; 2) электронные микрофотографии или рисунки

репродукции вирусов с репликацией генома: а) в цитоплазме, б) в ядре; 3) электронные микрофотографии или рисунки с изображением выхода из клетки хозяина дочерних популяций простых и сложных вирусов.

Задание 1: составьте а) графологическую схему «Формы взаимодействия «вирус – клетка». Отрадите в этой схеме формы продуктивности вирусной инфекции; б) таблицу «Механизмы взаимодействия «вирус – клетка»; в) таблицу «Механизмы разных форм продуктивности вирусной инфекции».

Задание 2: а) изучите этапы взаимодействия «вирус-клетка» при продуктивной инфекции по электронным микрофотографиям разных стадий репродукции вирусов и составьте таблицу «Этапы репродукции вирусов»; б) сделайте рисунок «Этапы репродукции вирусов»; в) дайте письменные ответы на поставленные вопросы в протоколе занятия.

При выполнении указанных заданий используйте указания в протоколе дневника лабораторных работ по вирусологии (протокол № 5).

Тема 6 Принципы классификации вирусов животных, человека и растений

6.1 Основные семейства

6.2 Фитовирусы

6.1 Основные семейства

Вирусы отнесены к царству *Vira*. По типу нуклеиновой кислоты выделяют *рибовирусы* (РНК-вирусы) и *дезоксирибовирусы* (ДНК-вирусы). Для вирусов предложены следующие таксономические категории (по восходящей): Вид (*Species*) → Род (*Genus*) → Подсемейство (*Subfamilia*) → Семейство (*Familia*). Категории подсемейств и родов разработаны не для всех вирусов.

Название всех вирусных родов оканчивается словом «*virus*», для названия семейств используется суффикс «*-idae*», а подсемейств – «*-inae*».

Из более чем 55 семейств вирусов, признанных Международным комитетом по таксономии вирусов, следующие 19 включают вирусы человека и животных: *поксвирусы*, *иридовирусы*, *вирусы герпеса*, *аденовирусы*, *паповавирусы*, *вирусы гепатита В*, *парвовирусы*, *реовирусы*, *тогавирусы*, *коронавирусы*, *парамиксовирусы*, *рабдовирусы*, *филовирусы*, *ортомиксовирусы*, *буньявирусы*, *аренавирусы*, *ретровирусы*, *пикорнавирусы*, *калицивирусы*.

К числу семейств вирусов исключительно позвоночных относятся *Herpesviridae*, *Adenoviridae*, *Papovaviridae*, *Paramyxoviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Arenaviridae*, *Coronaviridae*.

Размножаться в двух типах хозяев – позвоночных и беспозвоночных (клещи, комары, москиты) способны вирусы семейства *Bunyaviridae*, роды *Alpha virus* и *Flavivirus* семейства *Togaviridae*, вирусы родов *Vesiculovirus* и *Lyssavirus* семейства *Rhabdoviridae*, род *Orbivirus* семейства *Reoviridae*, вирус африканской лихорадки свиней семейства *Iridoviridae*. Такие вирусы составляют экологию

гическую группу арбовирусов, т. е. вирусов позвоночных, передающихся членистоногими.

6.2 Фитовирусы

Фитовирусы широко распространены в природе. В разных регионах Земли они поражают самые разнообразные виды растений: дикорастущие и возделываемые, одно- и многолетние, овощные и плодовые культуры, травянистые, кустарники и деревья. Больше всего фитопатогенных вирусов выделено из цветковых растений, из папоротников и голосеменных – в редких (единичных) случаях. Размножаясь, фитопатогенные вирусы вызывают закручивание, цветовую пестролистность, мозаику, скручивание, бугристость и другие деформации листьев; локальный и диффузный их некроз; обезображивание плодов; задержку роста растений.

Окончательная таксономия фитопатогенных вирусов далека от завершения, что во многом связано с трудностью их выращивания *in vitro* в протопластах клеток растений и однослойных культурах клеток насекомых-переносчиков, в которых не происходит полный цикл их развития.

Лучше всего изучены вирусы экономически важных культур. Среди них выделяют две группы фитопатогенных вирусов: обычные классифицированные вирусы и вириоды [греч. *-eides*, подобные], или вирусоподобные агенты. Подавляющее большинство классифицированных вирусов растений – РНК-вирусы семейств рабдо- и реовирусов. Исключение составляют изометрические вирусы (50 нм) мозаики цветной капусты и мозаики георгины, содержащие обычную двухцепочечную ДНК и дефектные сателлиты вируса некроза табака и кольцевой пятнистости табака с неполноценным геномом, репликация и созревание которых происходят только в присутствии родительского вируса-помощника.

Группа РНК-вирусов с полноценным геномом насчитывает около сотни видов. Большинство из них вирионы с одноцепочечной линейной цельной РНК. По морфологии их подразделяют на три подгруппы: а) бациллярные (около 10 видов), отличающиеся таким же поперечником, как и у рабдовируса желтой карликовости картофеля, имеющего размеры 380×75 нм; б) палочковидные (более 30 видов), поперечник которых не превышает 18 нм, а длина варьирует от 300 нм, как у вируса табачной мозаики (ВТМ) и близких ему вирусов зеленой крапчатости мозаики огурца, кольцевой пятнистой орхидеи, мозаики подорожника и гороха, до 1250 нм, как у вирусов желтой свеклы и пятнистого некроза гвоздики; в) изометрические (более 30 видов), в диаметре не превышающие 30 нм, типичными представителями которых являются вирусы мозаики костра, крапчатости коровьего гороха, мозаики огурца, некротической кольцевой пятнистости сливы, кольцевой пятнистости табака, желтухи ячменя, кустистой карликовости томата, желтой мозаики турнепса.

К вирусам с двухцепочечной сегментированной РНК относят вирус раневой опухоли, геном которого состоит из 11 фрагментов, сходные с ним вирусы карликовости кукурузы и риса, сахарного тростника островов Фиджи и измельченности початков кукурузы.

Классификация вирусов растений не поднялась пока выше создания родов. Кроме вирусов растений, вошедших в семейство *Reoviridae* (роды *Phytoreovirus* и *Fijivirus*), и рабдовирусов растений, насчитывается свыше 20 групп (родов) вирусов, поражающих высшие растения. Отличительной особенностью многих вирусов растений является разобщенный геном, фрагменты которого находятся в различных вирионах. Для репликации таких вирусов необходимо, чтобы в клетке присутствовали вирионы, несущие в сумме полный набор генома.

Фитовирусы, содержащие геномные РНК: *Carlavirus* – группа вируса латентной мозаики гвоздики, *Comovirus* – группа вируса мозаики коровьего гороха, *Cucumovirus* – группа вируса огуречной мозаики, *Nepovirus* – группа вируса кольцевой пятнистости табака, *Potexvirus* – группа ХВК (вирус Х картофеля), *Tobamovirus* – группа вируса табачной мозаики, *Tobravirus* – группа вируса погремковости табака, *Tombusvirus* – группа вируса кустистой карликовости томатов, *Tymovirus* – группа вирусов желтой мозаики турнепса, *Closterovirus* – группа вируса желтухи свеклы, *Hordeivirus* – группа вируса штриховатой мозаики ячменя, *Luteovirus* – группа вируса желтой карликовости ячменя, *Ilarvirus* – группа изометрических лабильных вирусов концевых пятнистостей.

Фитовирусы, содержащие ДНК: *Caulimovirus* – группа вируса мозаики цветной капусты.

Вопросы для самоконтроля

- 1 Назовите основные принципы классификации вирусов.
- 2 Приведите русские и латинские названия основных семейств вирусов человека и животных.
- 3 Назовите типовых представителей основных семейств вирусов и заболевания, вызываемые ими.
- 4 Назовите РНК-геномные и ДНК-геномные фитовирусы.

Лабораторное занятие 6

Основные семейства вирусов животных и растений

Цель занятия: изучить характеристики основных семейств вирусов на примерах их типовых представителей и приобрести навыки описания морфологии и структуры вирионов.

Материалы: 1) электронные микрофотографии и демонстрационные рисунки типовых представителей семейств вирусов: а) человека и животных, б) исключительно животных, в) насекомых, г) растений; 2) фотографии вирусной патологии: а) человека, б) позвоночных животных, в) насекомых, г) растений; 3) схемы строения вирионов основных семейств вирусов.

Задание 1: изучите по атласу и фотографиям морфологию и ультраструктуру типовых представителей основных семейств вирусов. Выполните задания, приведенные в дневнике лабораторных работ по вирусологии (протокол № 6).

Задание 2: классифицируйте по типу генома основные семейства вирусов человека и животных, указывая типового представителя. В протоколе дневника заполните таблицы «Основные семейства +РНК-геномных вирусов», «Основные семейства -РНК-геномных вирусов» и «Основные семейства +ДНК-геномных вирусов».

Задание 3: рассмотрите фотографии растений, пораженных вирусами. В протоколе дневника заполните таблицу «Основные семейства фитовирусов».

Литература

- 1 Авакян, А. А. Атлас анатомии и онтогенеза вирусов человека и животных. / А. А. Авакян, А. Ф. Быковский. – Москва, 1970. – 240 с.
- 2 Вирусология: в 3-х томах. / под редакцией Б. Филдса, Д. Найпа. – Т. 1 – М. : Мир, 1989. – 499 с.
Т. 2 – М.: Мир, 1989. – 248 с.
Т. 3 – М.: Мир, 1989. – 246 с.
- 3 Вирусология: учебно-методическое пособие. / Л. П. Титов [и др.]. – Мн.: БГМУ, 2003. – 76 с.
- 4 Коротяев, А. И. Медицинская микробиология, вирусология, иммунология. / Коротяев А. И., Бабичев С. А. – М. : ООО «Медицинское инфомационное агенство», 2001. – 736 с.
- 5 Павлович, С. А. Основы вирусологии: учебное пособие. / Павлович С. А. – Мн. : Выш. шк., 2001. – 192 с.
- 6 Поздеев, О. К. Медицинская микробиология: учебник для вузов. / О. К. Поздеев. – М. : ГЕОТАР-МЕД, 2002. – 768 с.

Шевцова Людмила Викторовна
Бачура Юлия Михайловна

Вирусология
Практическое пособие

для студентов специальности 1 - 31 01 01 - 02
«Биология» (научно-педагогическая деятельность)

Редактор
Корректор

Подписано в печать . Формат .
Бумага офсетная. Ризография. Усл.печ.л. .
Уч.-изд.л. . Тираж 100 экз. Заказ .

Издатель и полиграфическое исполнение: