

# ВІРУСИ Й ПЛАЗМІДИ ЯК ОБ'ЄКТИ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ



# План лекції



- ☞ **Загальне поняття про трансдукцію і її значення для біотехнологічного використання вірусів і плазмід**
- ☞ **Біотехнологічні об'єкти, що використовують у якості векторів**

**У біотехнології віруси й плазміди використовують як вектори для перенесення генів під час трансдукції. Це належить до методу генної інженерії.**

**Трансдукція** – форма передачі генів від клітини-донора до клітини-реципієнта, причому остання не є нащадком першої (т. зв. “горизонтальне перенесення генів”). Трансдукція відбувається за допомогою трансдукційної частинки, що формується за допомогою вірусів. Трансдукція завжди призводить до зміни спадкових властивостей клітини-реципієнта і генетичний матеріал, одержаний від донора, передається нащадкам донора по спадковості. Лише у випадку **абортивної трансдукції** донорна ділянка ДНК не дуплікується, а переходить лиш до одної з дочірніх клітин реципієнта.

# Трансдукція

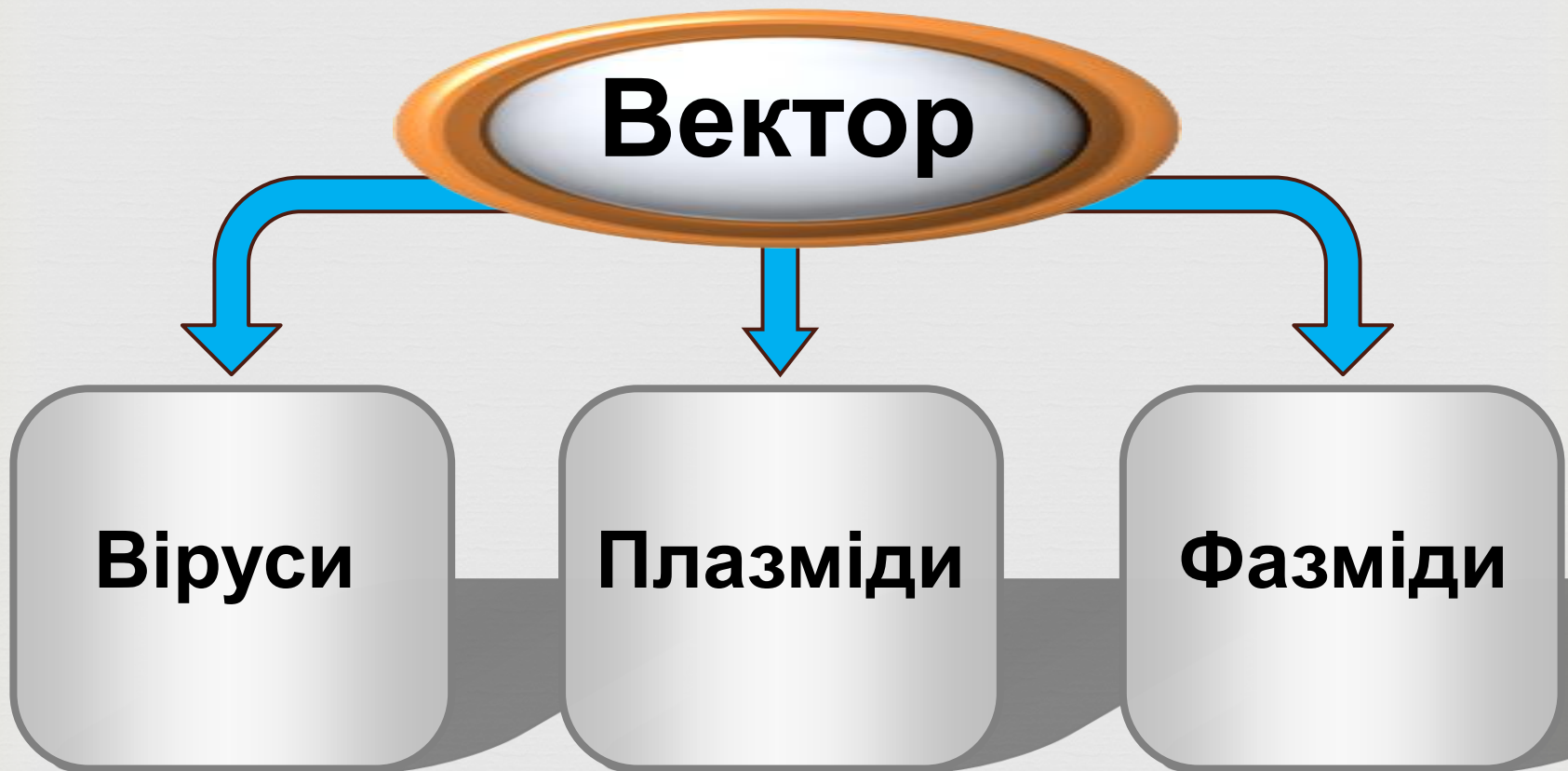
## Загальна

Переноситься  
будь-яка ділянка  
геному донора

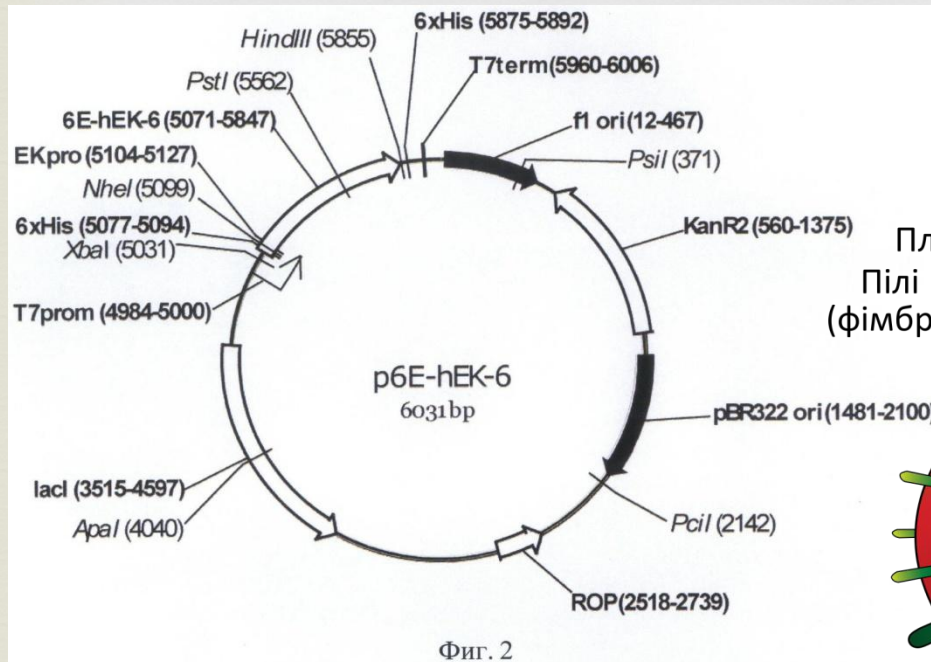
## Спеціальна

Переноситься  
завжди один і той  
самий набір генів  
донора

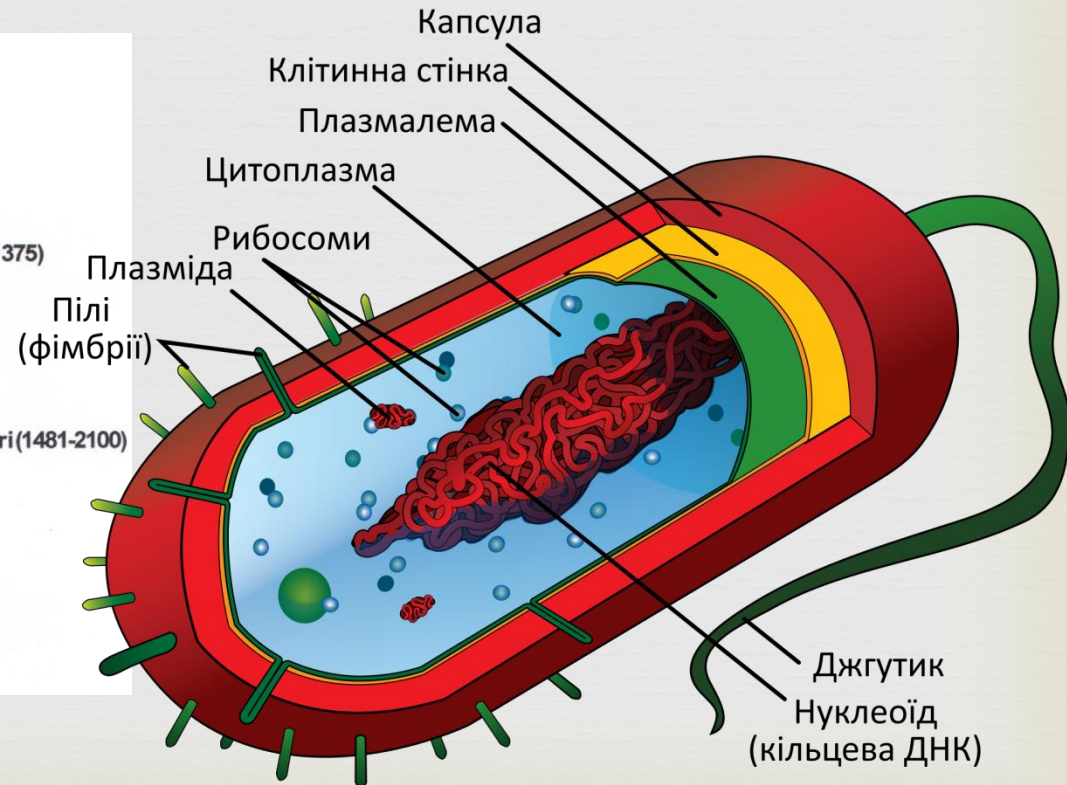
**Вектор** – це молекула нуклеїнової кислоти (найчастіше ДНК), що використовується в генній інженерії для трансферації (перенесення) генетичного матеріалу від клітини-донора, до клітини-реципієнта.



**Плазміди** – це невеликі переважно округлі дволанцюгові молекули ДНК, що не належать до нуклеоїда прокариот чи хроматину еукаріот. Характерні переважно для бактерій, інколи трапляються і в еукаріот (півні дріжджі). Плазміди здатні до автономної реплікації і передаються від клітин-донорів до реципієнтів шляхом кон'югації або трансформації.

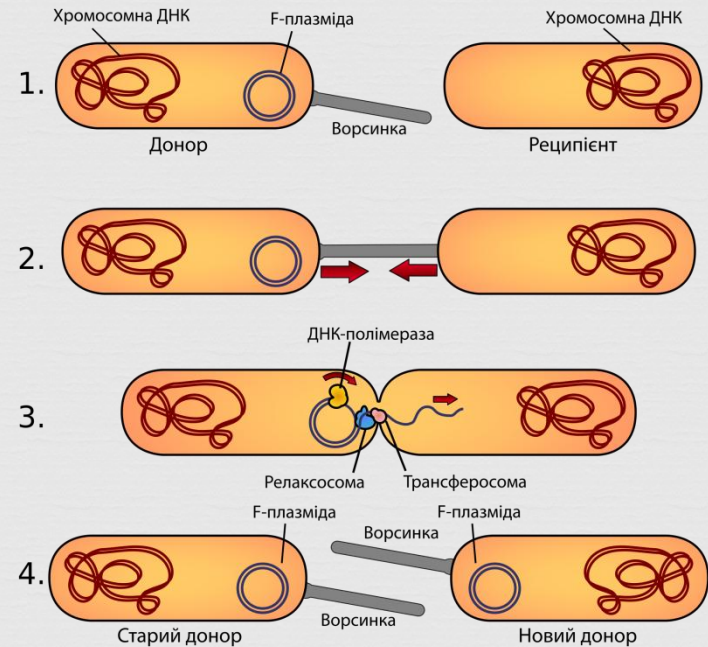
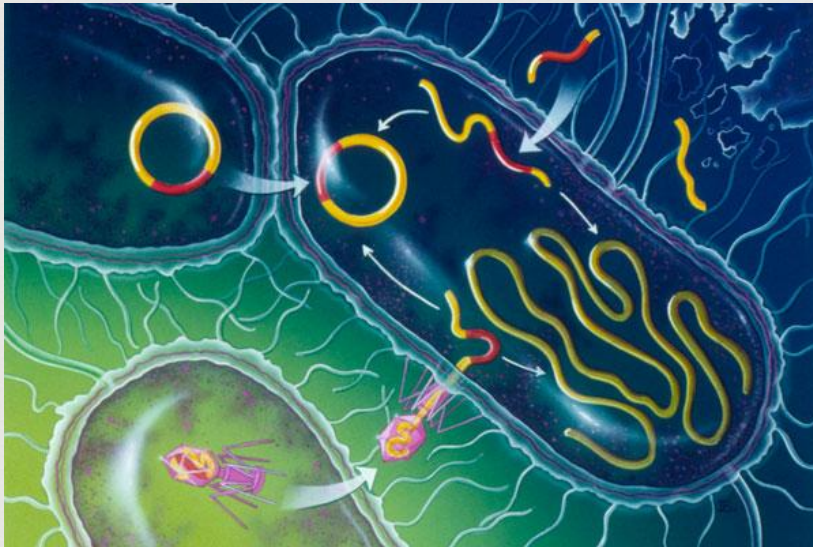


Фиг. 2



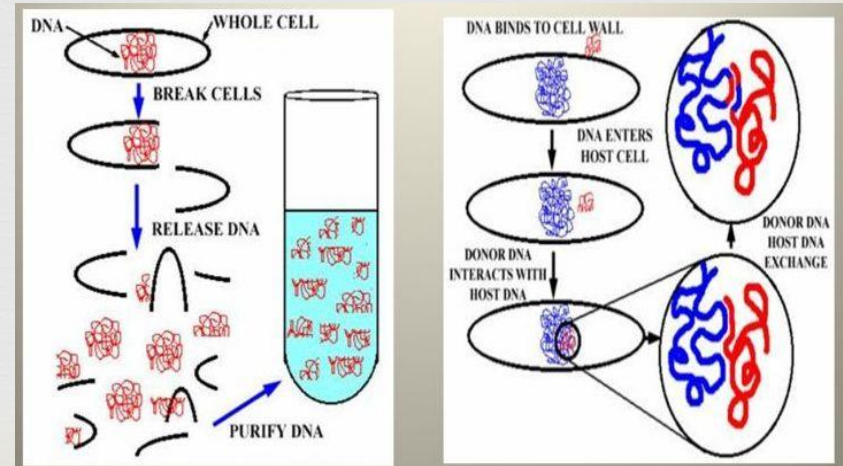
# Кон'югація

Передача генетичного матеріалу між бактеріями через прямий міжклітинний контакт.



# Трансформація

Генетична модифікація клітини шляхом введення і подальшої експресії в ній чужорідного генетичного матеріалу (ДНК).



# Класифікація плазмід за функціями

## F-плазмід

Плазмід фертильності, необхідні для одного з типів статевих процесів бактерій – кон'югації.

## R-плазмід

Плазмід опору, які містять гени, що можуть надати клітині стійкість (резистентність) до антибіотиків чи токсинів. Історично відомі як R-фактори, до того як природа плазмід була розкрита.

## Col-плазмід

Плазмід, що містять гени які кодують синтез білка-коліцина, який може чинити згубну дію на інші бактерії.

## Деградаційні

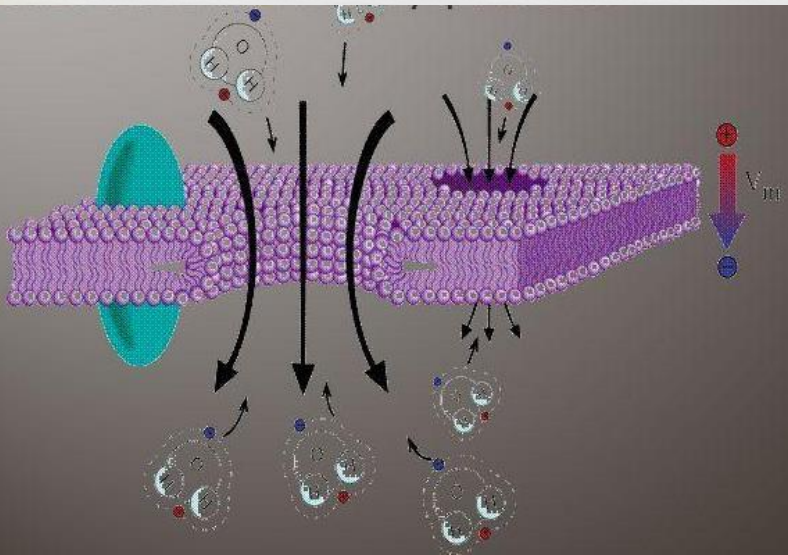
Плазмід, які допомагають розщепленню різних речовин, наприклад, толуолу або саліцилової кислоти.

## Отруйні

Плазмід, які які перетворюють бактерію на патоген.



**Фазміди** – це молекулярні вектори, створені штучно внаслідок гібридизації бактеріофага та плазміди. Фазміди здатні до реплікації, як і плазміди, або ж перебувають у вигляді одноланцюгових молекул ДНК, що запаковані у вірусні капсиди. Їх використовують для клонування фрагментів ДНК методом трансформації або електропорації. На відміну від плазмід, фазміди, окрім векторної ДНК, містять допоміжний бактеріофаг, котрий після зараження бактерії-реципієнта забезпечує активний синтез одноланцюгової ДНК, а також її упакування в капсиди й виділення з клітини-реципієнта.



## Електропорація

Утворення пор у ліпо-протеїдній мембрані під впливом електричного поля. Цей метод використовують для індукції проникнення макромолекул у клітину-реципієнт.

**Косміди** – це плазмідни, що містять фрагмент ДНК Фага  $\lambda$  (фаг лямбда), обов'язково із *cos*-ділянкою (звідки й назва цих векторів). *cos*-ділянка відповідає за упакування косміди у віріони фага, а точка *ori*, що також міститься на косміди – за реплікацію її у клітині бактерії.

За допомогою космід можна клонувати ділянки ДНК розміром 32-47 тисяч пар нуклеотидів, тоді як плазмідни, що перевищують своїми розмірами 4-5 тисяч пар стають нестабільними, оскільки у них підвищується схильність до рекомбінації (обміну генетичним матеріалом шляхом розриву та з'єднання різних молекул нуклеїнових кислот).

Отримані фагові частинки із рекомбінантними космідами використовують для інфікування клітин кишкової палички.

У цитоплазмі косміди циклізуються завдяки з'єднанню липких кінців (*cohesive ends* - *cos*-ділянка) і далі реплікуються як звичайні плазмідни, не проявляючи ніяких функцій фага лямбда.

# Віруси



Неклітинні живі форми, які складаються з нуклеїнової кислоти (ДНК або РНК) і білкової оболонки, зрідка включаючи інші компоненти (ферменти, ліпідні оболонки тощо). Усі віруси є облігатними внутрішньоклітинними паразитами і здатні розмножуватись тільки в живих клітинах, у яких вони використовують їхній ферментативний апарат і “перемикають” клітину на синтез зрілих вірусних часток – віріонів.

## Як вектори використовують:

Аденовіруси

Ретровіруси

Вірус SV40

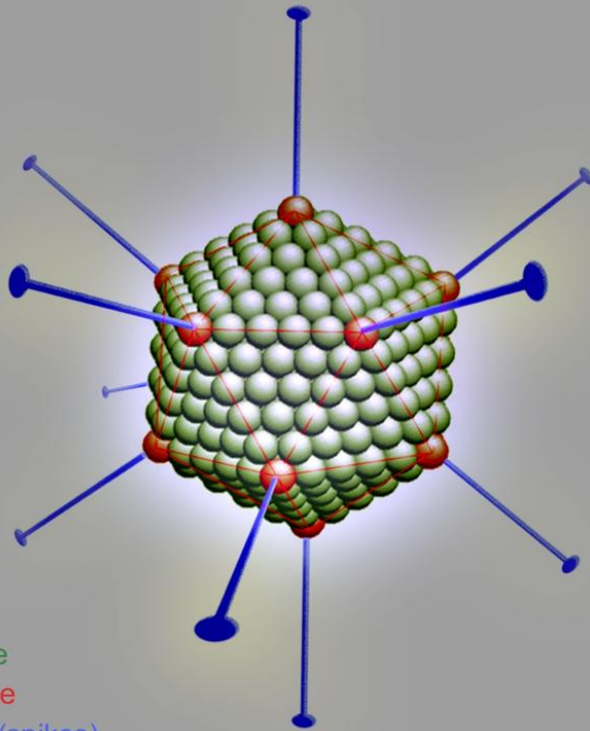
Герпесвіруси

Аденоасоційований вірус

# Аденовіруси (*Adenoviridae*)



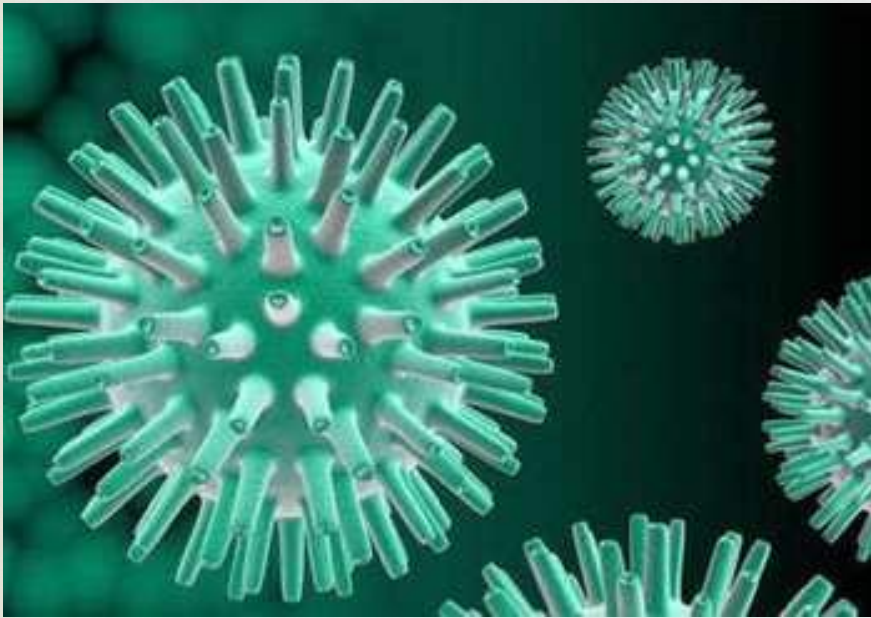
Kapsid eines Adenovirus



Hexone  
Pentone  
Fibern (spikes)

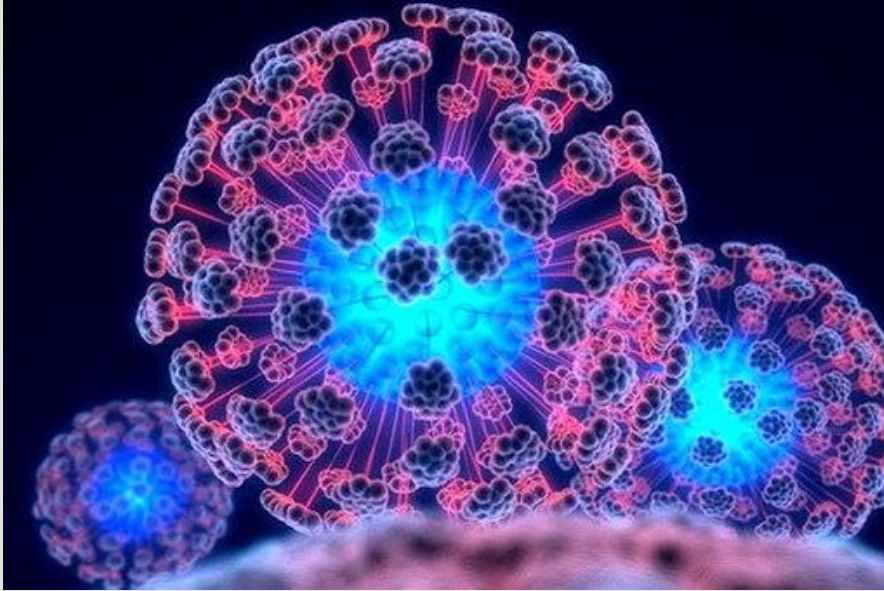
Родина ДНК-вмісних вірусів, як спричинюють гострі респіраторні захворювання у людей та тварин. Можуть уражати риб, рептилій, птахів, ссавців, людей. Деякі віруси спричинюють пухлини. У біотехнології їх використовують у якості вірусних векторів завдяки їхній здатності розмножуватись як у проліферуючих клітинах, так і в таких, що не діляться.

# Герпесвіруси (*Herpesviridae*)



Родина ДНК-вмісних вірусів, які можуть уражати людину і різноманітних тварин. Наразі відомо близько 200 видів герпесвірусів. Вони спричиняють хронічні захворювання з довічною персистенцією у вигляді дволанцюгової кільцевої ДНК в нейронах чуттєвих гангліїв. У клітинах уражених тканин утворюються внутрішньоядерні включення. Ранні включення (тільця Каудрі) містять ДНК і заповнюють все ядро, відтісняючи хроматин до краю ядра. Пізні включення не містять ДНК.

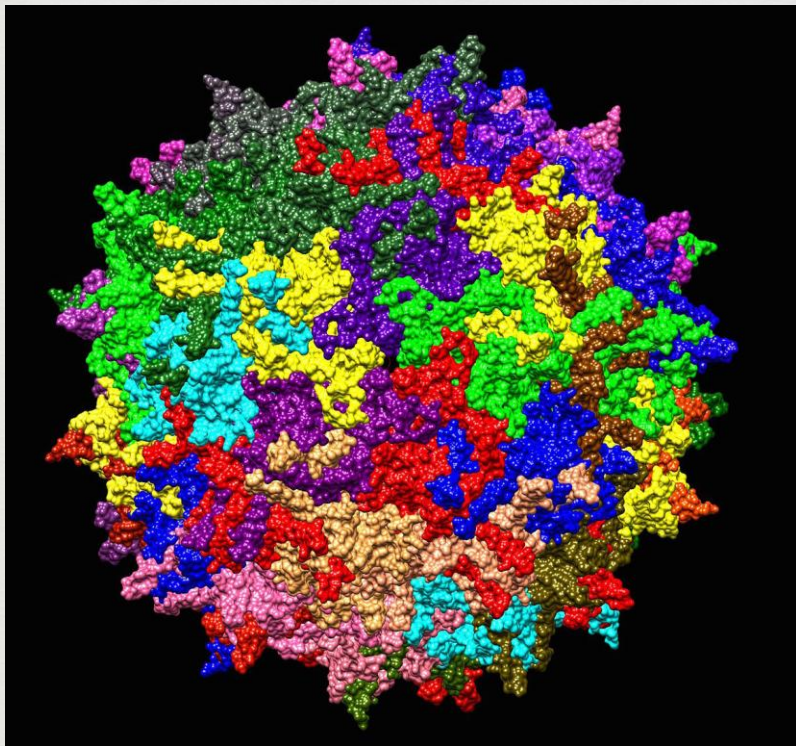
# Ретровіруси (*Retroviridae*)



Родина РНК-вмісних, оточених мембраною вірусів. Їхній РНК-геном реплікується через ДНК, як проміжну ланку. Ретровіруси залежать від ферменту зворотної транскриптази для здійснення зворотної транскрипції свого геному з РНК в ДНК, який може потім бути об'єднаний з геномом реципієнта за допомогою ферменту інтегрази, після чого вірус реплікується разом з геномом клітин носія. Відомим представником ретровірусів є вірус імунодефіциту людини (ВІЛ).

# Аденоасоційований вірус

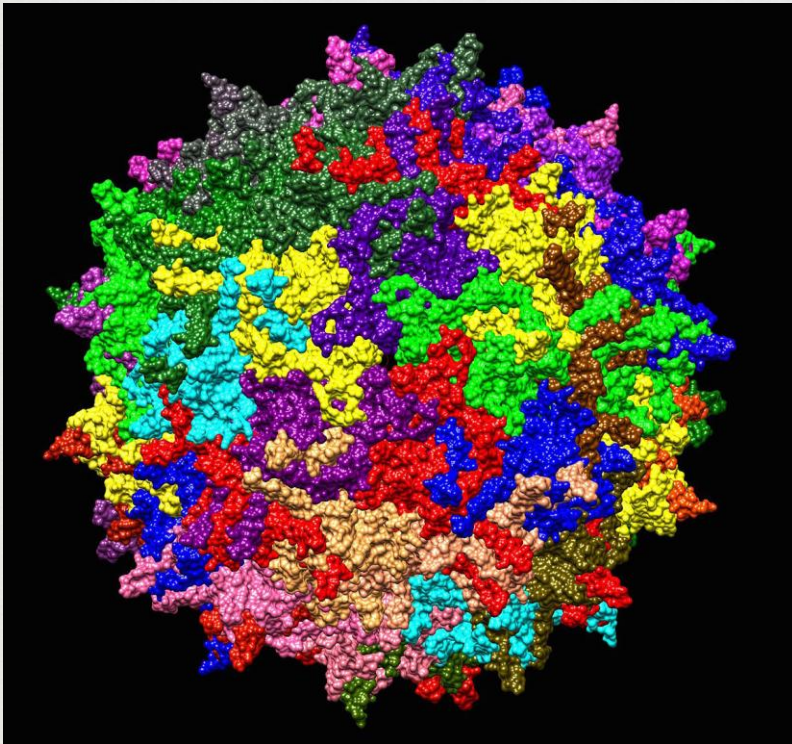
(Adeno-associated dependoparvovirus)



Невеликий вірус з родини Парвовіруси (*Parvoviridae*), що вражає клітини людини і приматів. Він не викликає захворювань, тому й спричиняє слабку імунну реакцію. Може вражати як проліферуючі клітини, так і клітини, що не діляться, за що є цінним біотехнологічним об'єктом (вектором). Непатогенність надає йому більшої передбачуваності ніж ретровіруси, що можуть спричинити мутації (а як наслідок розвиток раку), адже вбудовуються в клітини реципієнта хаотично. ДНК цього віруса вбудовується в ДНК клітини майже завжди чітко у специфічному сайті.

# Вірус SV40

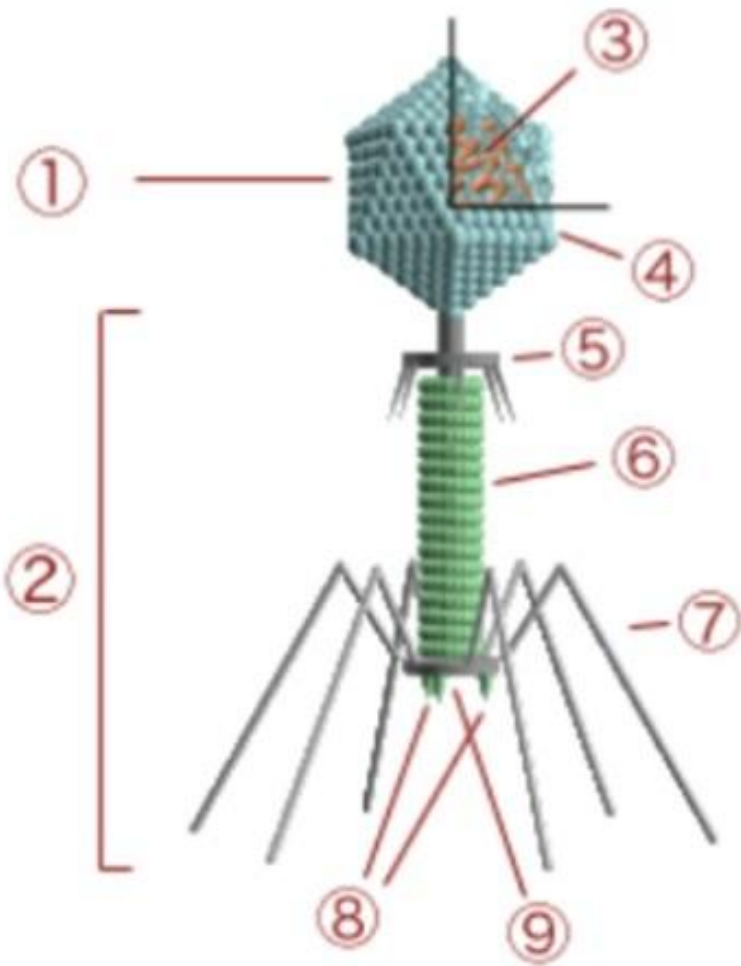
(*Macaca mulatta polyomavirus 1*)



Вірус з родини Поліомавіруси (*Polyomaviridae*), що містить кільцеву дволанцюгову молекулу ДНК. На основі цього віруса були створені перші вектори для культур клітин ссавців. Патогенність цього віруса для людей на сьогодні повністю не доведена. Хоча він здатен викликати ріст пухлин у щурів і хом'яків, у людини патологічних впливів поки не виявлено.



# Бактеріофаги



## Структура фага T2.

1-голівка, 2-відросток, 3-нуклеїнова кислота, 4-капсид, 5-комірець, 6-чохол, 7-хвостві нитки, 8-шипи, 9-базальна пластинка.

Віруси, що вражають бактерії. Систематичне положення наразі не розроблене. Фаги як й інші віруси нерухомі. Взаємодія вірусу з клітиною реципієнта починається після випадкового зіткнення у середовищі. Життєвий цикл бактеріофагів, які потрапили до клітини, може проходити двома шляхами, які суттєво відрізняються. Відповідно виділяють вірулентних (що заражають клітину, розмножуються й руйнують завдяки дії ферменту лізоциму стінки клітини й вірусні частки таким чином виходять назовні) та лізогенних фагів (котрі не спричиняють раптового лізису клітини, а вбудувавшись у ДНК реципієнта можуть перебувати у напівлатентному стані тривалий час, утворюючи невелику кількість вірусних часток, котрі заражають довколишні клітини).

Бактеріофаги в біотехнології використовують як вектори, що переносять ділянки ДНК в клітини продуцентів-бактерій. Інколи бактеріофаги здатні забезпечувати природну трансдукцію, тобто транспортувати ділянки ДНК між бактеріями без втручання людини. Найпоширенішим вектором є фаг  $\lambda$ , що містить дволанцюгову лінійну ДНК. Ліве та праве “плече” фага містять усі необхідні гени для його реплікації та розмноження, а середню частину генома, що відповідає за лізогенію, заміняють на векторну ДНК. Такі модифіковані фаги проходять свій життєвий цикл, але лізис клітини-реципієнта не відбувається. Вектори на основі фага  $\lambda$  використовують для клонування фрагментів ДНК еукаріот, що є значно довшими за бактеріальні гени і становлять 25-50 тисяч пар нуклеотидів. Проте, фаги з короткими вставками (менше 38 тис. п. нукл.) і надто великими (більше 52 тис. п. нукл.) не здатні вражати бактерії.



Дякую за увагу!