

Київський національний університет імені Тараса Шевченка

**Методичні рекомендації
до спецпрактикуму «Віруси мікроорганізмів» (96 год)
для студентів денної форми навчання
ННЦ «Інститут біології»
Київського національного університету імені Тараса Шевченка**

**КИЇВ
2011**

Методичні рекомендації до спецпрактикуму «Віруси мікроорганізмів» для студентів денної форми навчання ННЦ «Інститут біології» / Київський національний університет імені Тараса Шевченка. - К: ТОВ «Сучасні печатні технології «Бавок». - Упорядник О.М. Андрійчук, Т.П. Шевченко, А.В. Харіна, В.П. Поліщук - 2011. - 47 с.

Рецензенти: В.К. Позур – д.б.н., професор,
С.В. Демидов – д.б.н., професор

Затверджено вченою радою
ННЦ «Інститут біології»
31 січня 2011 року

ВІРУСИ МІКРООРГАНІЗМІВ

Вступ

Бактеріофаги – віруси бактерій, представляють собою відносно просту біологічну систему і є зручною моделлю для вивчення основних проблем вірусології, молекулярної біології та біотехнології. Значні успіхи у вивченні механізмів реплікації нуклеїнових кислот, досліджень тонкої структури генетичного матеріалу, молекулярного механізму мутацій, регуляції білкового синтезу і багато інших досягнень біології пов'язано із застосування бактеріофагів як зручних модельних об'єктів.

Фаги, подібно всім іншим вірусам, є абсолютними клітинними паразитами. Вони несуть інформацію, необхідну для власної репродукції і водночас не мають власних енергосинтезуючих систем та білок-синтезуючих механізмів. Фаги є найбільш численною групою вірусів на Землі. Їх можна знайти у всіх можливих еконішах, що зайняті їх господарями – бактеріями. Бактеріальні віруси уражують фітопатогенні бактерії, актиноміцети, синьо-зелені водорості, мікоплазми.

Залежно від типу взаємодії з мікробною клітиною розрізняють вірулентні та помірні, помірно-вірулентні та вірулентно-помірні бактеріофаги. Помірні фаги можуть мати неінфекційну форму - форму профага.

Більшість фагів мають ДНК-геном, але є і РНК-геномні фаги. За формою віріона їх поділяють на 4 групи:

- 1) фаги, що мають ізометричну голівку і відросток;
- 2) ізометричні фаги;
- 3) ниткоподібні фаги;
- 4) плеоморфні фаги.

Згідно останньої класифікації віруси бактерій виділені в 1 порядок, 13 родин та 31 рід. При їх класифікації використовують близько 40 критеріїв.

Генетична інформація фагів закодована в його нуклеїновій кислоті, білок захищає геном від дії зовнішніх факторів та виконує структурну функцію, а також забезпечує проникнення нуклеїнової кислоти в чутливу клітину, відповідає за антигенні та імуногенні властивості вірусу.

Об'єктами дослідження, що наведені у спецпрактикумі, є широко розповсюджені фітопатогенні бактерії родів *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Erwinia* і фаги, що викликають їх лізис.

Мета практикуму – закріпити знання, отримані студентами при вивченні спецкурсу «Віруси мікроорганізмів» та примінити їх у вигляді науково-дослідницької роботи по виділенню та дослідженню властивостей вірусів бактерій та їх структурних компонентів.

Теоретична частина

Загальна характеристика вірусів бактерій

Більш ніж 95% всіх описаних у літературі фагів відноситься до порядку *Caudovirales*. Їх віріони складаються по масі приблизно порівну з НК та білку, з ікосаедричними головками, зібраними з багатьох копій одного чи декількох структурних білків; кути як зазвичай, представлені пентамерами білку, решта поверхні віріону – гексамери. За відмінностями морфологічної будови хвостового відростку виділяють 3 основних родини: 60% фагів відносяться до родини *Siphoviridae*, вони мають довгі гнучкі хвостові відростки, 25% — до *Myoviridae*, з скоротливим хвостовим відростком, та решта 15% — *Podoviridae* з коротким хвостовим відростком. Представники останньої родини можуть нести в складі головки віріону декілька ключових білків, які здатні формувати структуру, подібну до гнучкого хвостового відростку відразу після перших етапів рецепторної взаємодії з чутливою бактеріальною клітиною.

За Abedon (2005) в літичному циклі розвитку фагу є декілька ключових моментів, які є визначальними при розвитку інфекції:

- позаклітинний пошук, що лімітується рівнями дифузії фагу та бактерії, і таким чином залежить від концентрації господаря;
- адсорбція фагу, що включає в себе зворотне та незворотне приєднання фагу, незворотне прикріплення, перенос геному вірусу в клітину, що відбувається досить швидко після успішного зіткнення фагу з чутливою бактерією;
- інфекційний процес, протягом якого бактеріальний метаболізм повністю перебудовується, геном фагу реплікується та відбувається збірка віріонів;
- для помірних фагів необхідно включити невизначений період лізогенного стану, протягом якого гени фагу, що відповідають за розвиток літичного процесу, є репресованими, і фаговий геном реплікується разом з клітинним при кожному поділі бактерії. При знятті репресії з літичних генів стартує інфекційний процес, що закінчується збіркою віріонів та їх виходом з клітини шляхом лізису останньої.

Адсорбція та лізис клітини є відносно швидкими етапами. Тому фаг більшість часу перебуває: (i) у позаклітинній формі пошуку чутливих бактерій; (ii) у зв'язаній з інертними макрочастками формі; (iii) існуючи у вигляді профагу (помірні фаги).

При перших двох умовах існування фаг може бути інактивований за рахунок пошкодження або капсиду, або геномної НК, проте можливий

варіант збереження інфекційності протягом багатьох років, залежно від умов зовнішнього середовища.

Характеристика вірусів мікроорганізмів

Бактеріофаги – це віруси, що уражують виключно бактеріальні клітини. Бактеріофаги широко розповсюджені в природі. На даний момент не існує жодної відомої бактерії, яка б не могла бути ураженою бактеріофагом чи не несла у своєму геномі профаг (інтегровану нуклеїнову кислоту фага). Бактеріофаги відомі для усіх типів бактерій без виключення: від бактеріальних паразитів роду *Dellovibrios* і до порівняно крупних синьо-зелених водоростей.

Як і будь-які інші віруси, фаги є носіями усіх основних вірусних ознак, що чітко відрізняє їх від інших об'єктів живої природи:

- Наявність одного типу нуклеїнової кислоти (ДНК чи РНК).
- Відсутність власного білок-синтезуючого апарата.
- Не спроможність до росту та розмноження на поживних середовищах.
- Диз'юнктивна (розрізнена) збірка віріонів.
- Здатність до кристалізації.
- Не інфекційність поза клітиною.

Бактеріофаги є зручними об'єктами для досліджень за рахунок швидкого накопичення інфекційного матеріалу та відносній простоті маніпуляцій із їх геномом.

Більшість фагів складаються із двох структурних компонентів – головки і відростку, кожний з яких виконує певну функцію в залежності з їх хімічною природою. Головка фага представляє собою молекулу нуклеїнової кислоти – ДНК або РНК, оточена білковою оболонкою, відросток – стрижень, який оточений білковим чохлам. Нерідко фаговий відросток виражений дуже слабко, а іноді і зовсім відсутній. Крім того зустрічаються фаги, які мають паличковидну форму - іноді довгих і зігнутих.

Генетичну функцію у фагів виконує нуклеїнова кислота, фаговий білок механічно захищає нуклеїнову кислоту від зовнішніх дій і приймає активну участь в процесі проникнення нуклеїнової кислоти в чутливу клітину. З білком пов'язані ферментні системи фагів. Фагова оболонка (капсид) складається з окремих структурних компонентів – субодиниць, які представляють собою поліпептидні ланцюги. Нуклеїнова кислота фагів

характеризується різноманіттям структури та молекулярних мас – від високомолекулярних дволанцюгових ДНК з молекулярною масою $120-130 \times 10^6$ Д до низькомолекулярних одноланцюгових РНК з молекулярною масою $1-2 \times 10^6$ Д.

Основна функція фагів – репродукційна, відбувається шляхом інфікування бактеріальних клітин зрілими (активними) фаговими часточками. Даний процес отримав назву фагової інфекції.

Бактеріофаг може існувати в трьох станах – профага, вегетативного фага, зрілого фага. У вільному стані фаги інертні. Після адсорбції на клітині – хазяїна нуклеїнова кислота фага проникає всередину клітини, де починає реплікативний цикл. Від зрілого фага така частинка відрізняється в багатьох відношеннях, її називають вегетативним фагом, внаслідок притаманної їй необмеженої здатності до відтворення. Здатністю існувати в третьому стані, а саме в стані профага, характеризуються помірні фаги. Інфікуючи чутливу бактеріальну клітину, помірний фаг може переходити у інтегрований стан, який входить в спадково закріплені симбіотичні взаємовідносини з клітиною – господарем, відомі під назвою лізогенія.

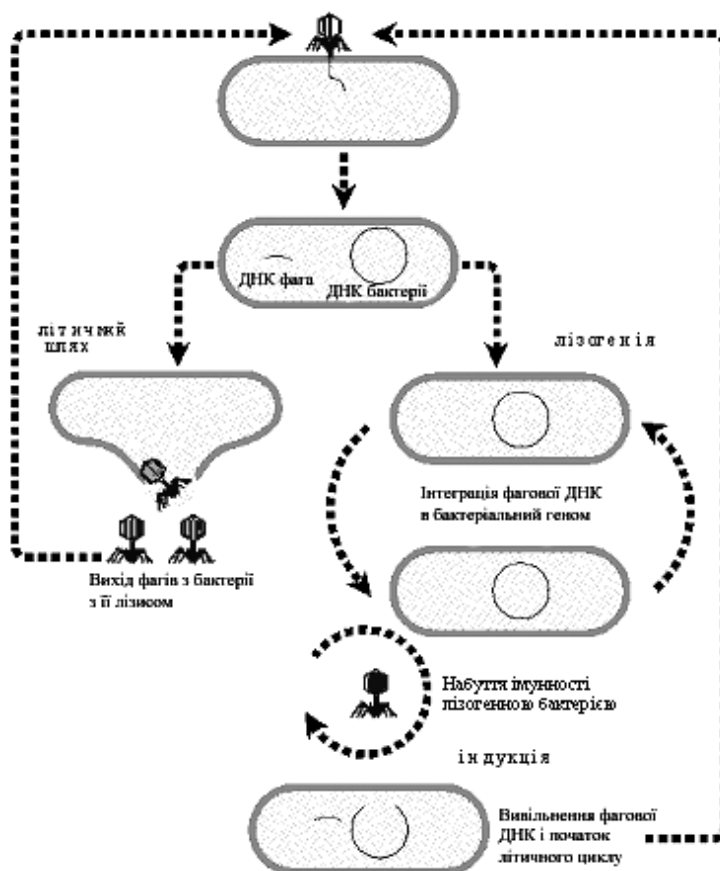


Схема лізогенного та продуктивного типу взаємодії фагів з бактеріальною клітиною.

Вірулентні та помірні фаги

Фаги можна також розділити на 2 класи за характером їх життєвої стратегії: **вірулентні та помірні**.

Вірулентні фаги можуть репродукуватися лише шляхом літичного циклу; віріон фагу адсорбується на поверхні бактеріальної клітини та впорскує всередину НК, що призводить в кінцевому результаті до припинення всіх метаболічних процесів клітини та встановлення вірусних репродуктивних систем, що розпочинають синтезувати вірус-специфічні білки. Клітини господаря лізуються через певний проміжок часу, вивільняючи нове покоління фагів.

Помірні фаги мають вибір репродуктивної стратегії. Іноді помірний фаг ініціює літичний процес, що теж приводить до утворення багатьох нових віріонів паралельно з лізисом. Альтернативним варіантом є лізогенний шлях, при якому замість реплікації геном фагу переходить в стан спокою, часто інтегруючись з геномом клітини чи зберігаючись у вигляді плазмід. В цьому стані профаг, так ще називають інтегрований фаг, може знаходитися невизначено довгий час, при цьому при реплікації клітини передається дочірнім клітинам. Ці клітини стають лізогенізованими, або/і набувають властивість лізогенних. При певних умовах профаг може вийти зі стану спокою та піти по літичному шляху. Помірні фаги можуть „захищати” своїх господарів проти інфекції спорідненими фагами та викликати досить значні зміни властивостей своїх господарів, включаючи зміни в системі рестрикції-модифікації, стійкості до антибіотиків та інших стресових чинників зовнішнього середовища. Деякі помірні фаги навіть можуть перетворювати своїх господарів до патогенного фенотипу, як наприклад, дифтерійний чи ентерогеморагічні (ЕНЕС) штами *E. coli*. До найбільш досліджених помірних фагів відносяться фаг λ , P1, P22, Mu. Варто відмітити, що мутації деяких генів, що відповідають за лізогенний тип розвитку, можуть приводити до появи вірулентних нащадків, які все - таки відносяться до групи помірних фагів.

Взаємодія бактеріофагів з бактеріями, розмноження бактеріофагів

Застосування електронної мікроскопії, методу мічених атомів та інших методів дало змогу докладно вивчити взаємодію фагів з бактеріальними клітинами. В цьому процесі розрізняють два типи взаємодії - **літичний і лізогенний**.

Перший закінчується лізисом (руйнуванням) ураженої клітини і призводить до виходу зрілих фагових частинок з клітини, а другий не руйнує уражену клітину, а робить її носієм фага.

Літичний тип взаємодії фагів з бактеріями часто ще називають (як і для інших вірусів) продуктивною інфекцією. При такому типі взаємодії фага з клітиною хазяїна розрізняють чотири стадії або етапи: 1) адсорбцію фагів на поверхні бактеріальних клітин; 2) проникнення активного вмісту (нуклеїнової кислоти) в бактеріальну клітину; 3) латентний період (екліпс) внутрішньо-клітинного розвитку фага; 4) руйнування (лізис) клітини і вихід з неї новоутворених фагів. Найкраще вивчено першу стадію розмноження фагів - адсорбцію. Фаги, які мають відростки, адсорбуються на поверхні фагочутливих бактерій дистальним кінцем цих відростків, а базальна пластинка з шипами і нитками забезпечує тісний контакт. Фаги можуть прикріплюватися до різних ділянок клітини джгутиків, ворсинок чи інших виростів. Адсорбція фагів на клітинах-специфічна реакція. Вона зумовлена утворенням тісного зв'язку між спеціальним рецепторним апаратом фага і специфічними рецепторами клітини. Фагорецептори бактеріальної клітини є складними антигенними комплексами або структурами, які розташовані в різних ділянках і шарах клітинної стінки.

Адсорбцію фагів на сприйнятливих до них бактеріях можна спостерігати в електронний мікроскоп. Вона залежить від фізичних і хімічних властивостей середовища, температури, природи фага, фізіологічного стану бактерій, а також від їх антигенних структур.

Після адсорбції фага на поверхні бактерій за допомогою ферменту типу лізоцима, який міститься в нижній частині відростка, відбувається розчинення клітинної стінки, і в цей невеличкий отвір кінець відростку, втискуючись (завдяки енергії АТФ), як «шприц», впорскує нуклеїнову кислоту із головки фага в бактеріальну клітину. Білкова оболонка фага залишається на поверхні бактерії і не бере подальшої участі в розмноженні фага. Слід зазначити, що до сих пір детально не з'ясовано механізм введення нуклеїнової кислоти у фагочутливу клітину фагами, які не мають відростків, а також тими фагами, в яких відростки не скорочуються.

З моменту проникнення геному фага в бактерію починається третя стадія його взаємодії з клітиною - латентний (прихований) період внутрішньоклітинного розвитку фага. Тривалість цього періоду в різних фагів триває від 15-40 хв до 5 год і більше. На цій стадії нуклеїнова кислота фага, завдяки закодованій у ній інформації, спричинює швидку перебудову внутрішніх біосинтезуючих процесів у бактеріальній клітині, повністю спрямовуючи їх на утворення нових частинок фага.

На початку третьої стадії розмноження, у екліпс-фазі, виявити в зараженій клітині вегетативний фаг не вдається. Проте саме в цей час під його впливом відбувається пригнічення функцій до синтезу низки клітинних ферментів і водночас індукується процес утворення фагових ферментів або так званих ранніх білків, які каталізують процеси реплікації фагової ДНК з використанням нуклеотидів нуклеїнових кислот самої бактеріальної клітини.

Дещо пізніше в клітині починається синтез пізніх білків, які є структурними білками фагів. У результаті агрегації таких білків відбувається побудова окремих елементів нових фагів: головок, відростків, базальних пластинок тощо. Після утворення всіх компонентів фага здійснюється складання дозрілих віріонів фага відповідної форми. Залежно від виду фага, стану бактеріальної клітини та інших чинників у одній клітині може утворитися від кількох десятків до кількох сотень фагових частинок.

Отже, в результаті взаємодії вегетативного фага з чутливою клітиною у зараженій бактерії з'являється значна кількість нових корпускул фагів і ми говоримо про репродукцію фагів бактеріальною клітиною на основі генетичної інформації, заданої нуклеїновою кислотою батьківського фага. Саме в цьому й виявляється своєрідна форма паразитизму фагів на субклітинному молекулярному рівні.

Значення бактеріофагів:

- Зручні модельні системи:
 - бактеріофаги мають просту, але диференційовану структурну організацію, яка на сьогодні є добре вивченою;
 - вони швидко розмножуються;
 - відомі досить надійні методи накопичення, виділення та очистки бактеріофагів;
 - чітко виявляються за негативними колоніями.
- Переносять генетичну інформацію бактерій.
- Застосовуються в медицині та ветеринарії для:
 - Ідентифікації бактерій;
 - Лікуванні бактеріальних інфекцій.
- Проявляють активність проти бактерій.

Методи, які використовуються при дослідження вірусу:

- Методи титрування.
- Методи виділення, накопичення вірусів на різних модельних системах.
- Ультрацентрифугування.
- Виділення та дослідження нуклеїнової кислоти та білків вірусів.
- Електрофорез білку та нуклеїнової кислоти.
- Рентгеноструктурний аналіз.
- Гібридизація нуклеїнових кислот.
- Полімеразна ланцюгова реакція.

Пряма детекція вірусів:

- Візуальна діагностика
- Електронна мікроскопія
- Атомно-силова мікроскопія

Практичне застосування бактеріофагів:

1. Епідеміологічне фаготипування.
2. Фагоіндикація бактеріальних культур.
3. Використання в молекулярній біології.
4. Використання бактеріофагів для експресії білків (phage display).
5. Екологічний моніторинг.
6. Біоконтроль харчової продукції за допомогою фагів.
7. Фагова терапія.

8. Боротьба з патогенними бактеріями. Використання вірулентних фагів в якості лікувальних засобів проти захворювань, викликаних особливо стійкими патогенними бактеріями.

Теми практичних занять

Фітопатогенні бактерії добре ростуть на штучних середовищах. Вирощують їх на рідких (м'ясо-пептонний бульон МПБ) та твердих (м'ясо-пептонний агар МПА) поживних середовищах та мінеральних середовищ.

Виділити бактеріофаги можна з різних матеріалів, де є бактерії, на яких даний фаг розмножується. Фаги виділяють із лізогенних культур, довкілля (рослини, ґрунт, вода).

Тема 1. Виділення фагів, вирощування та збереження бактеріальних культур фітопатогенних бактерій

Мета. Ознайомити студентів з основними методами виділення фагів із оточуючого середовища та з використанням методу збагачення, одержання чистої лінії культури, застосування методів культивування бактеріальних культур у рідких та твердих поживних середовищах та вирощування бактеріальної культури на скошеному агарі.

Обладнання. Термостат на 28°C, стерильні фільтри, магнітні мішалки, бактеріологічні петлі, гумові груші, газові горілки.

Матеріали. Проби ґрунту, води, уражені овочі для виділення фагів, бактеріальні культури фітопатогенних бактерій родів *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Erwinia*.

Середовища: фізіологічний розчин, 0,7 та 1,5 % МПА.

Посуд та інструменти: пробірки, піпетки, колби, скляні шпателі.

Хід роботи

I. Виділення фагів з оточуючого середовища.

1. Приготувати 1% гомогенат матеріалу в поживному середовищі, з якого виділяють фаги.
2. Звільнити фаг від супутнього матеріалу фільтруванням через паперовий фільтр та центрифугуванням 20 хв при 3 000 об/хв. Відібрати надосад, перенести в чисту стерильну пробірку і додати 2 мл хлороформу.
3. Приготувати 1% завись бактеріальної культури в рідкому поживному середовищі.
4. Залити чашки Петрі 1,5% (нижнім) агаром.
5. Змішати 0,5 мл фаголізату з 0,2 мл тест –культури.
6. Вміст пробірки внести в 3-4 мл верхнього агару та вилити на нижній агар і поставити на інкубацію на 18-20 годин в термостат при 28°C.

7. Через 24 години врахувати результати. Присутність фагів виявляють за появою негативних колоній.
8. Зробити виміри розміру негативних колоній.

II. Виділення фагів з оточуючого середовища з використанням методу збагачення.

Суть методу полягає в тому, що досліджуваний матеріал вносять у поживне середовище, заражене відповідною чутливою культурою, до якої виділяють фаг.

1. Суміш інкубувати протягом доби в умовах термостату.
2. Відцентрифугувати при 4000 об/хв протягом 20 хв, відібрати надосад, профільтрувати через бактеріальний фільтр Зейтца.
2. Змішати 0,5мл фаголізату та 0,2 мл тест –культури.
3. Вміст пробірки внести в 2-3 мл верхнього агару та розподілити його на поверхню нижнього агару.
9. Поставити на інкубацію на 18-20 годин в термостат при 28°C.
4. Через 18 годин врахувати результати.

В результаті використання даної методики фаг розмножується на чутливій культурі, накопичується в поживному середовищі і тому його можна легко знайти в досліджуваному матеріалі.

Важливе значення при виділенні фагів має склад поживного середовища. Кращі результати отримують при використанні оптимальних для росту бактерій поживних середовищ та умов культивування.

III. Одержання чистої лінії бактеріальної культури

Для отримання чистої лінії бактеріальної культури вирощують окремі колонії клітин, розсіваючи бактерії методом «штриха».

1. Розлити середовище МПА в 1 чашці Петрі.
2. Із скошеного агару в стерильну петлю набирають культуру і висівають бактерії методом виснажливого штриха.
3. Чашку Петрі з висіяною культурою інкубують при температурі 28°C у термостаті протягом 18-24 год.

IV. Вирощування бактеріальної культури на скошеному агарі

1. Готуємо стерильні пробірки зі скошеним агаром.
2. Стерильною петлею набираємо бактеріальну культуру зі скошеного агару.

3. Методом «штриха» висіваємо на поверхню поживного агару.

Контрольні питання

1. Що ви розумієте під поняттям фітопатогенні бактерії, чим вони відрізняються від інших бактерій?
2. Дайте загальну характеристику бактеріофагам і визначте їх роль в сучасній біології.
3. Назвіть джерела (матеріали) виділення бактеріофагів.
4. Що означає «метод збагачення» і коли він застосовується?
5. Опишіть постановку експерименту, в ході якого був встановлений титр фага 25×10^7 БУО.
6. Як отримують «чисту» лінію фага?
7. Про які властивості фагів можна судити по характеру негативних колоній?

Тема 2. Визначення інфекційної активності фагів (титрування)

Титрування фагів проводиться з метою кількісного виявлення зрілих фагових часточок в 1 мл середовища. Для цього застосовують рідкі або тверді поживні середовища.

Титр фага (за Аппельманом) – це найбільше його розведення (або найменша кількість), яке повністю стримує (подавляє) ріст тест-культури в умовах рідкого поживного середовища.

Титр фага (титрування за Грація) – кількість часток фага в 1мл досліджуваного матеріалу. Кожна частинка фага утворює потомство, яке кількісно визначається візуально за наявністю на газоні чутливої культури зон лізису, які називаються негативними колоніями, бляшками, стерильними плямами. Одна негативна колонія – це одна фагова частка.

Мета. Ознайомити студентів з основними методами титрування фагів на чутливих культурах у рідкому та твердому поживному середовищах, прищепити практичні навички титрування фагів методами Грація та Аппельман.

Обладнання. Термостат на 28°C, бактеріологічна петля, гумові груші, штативи, газова горілка.

Матеріали. Грунт, вода, уражені овочі для виділення фагів, бактеріальні культури фітопатогенних бактерій родів *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Erwinia*.

Середовища: фізіологічний розчин, 0,7 та 1,5 % МПА.

Посуд та інструменти: пробірки, піпетки, чашки Петрі.

1. Метод агарових шарів за Грація (титрування фага на твердому поживному середовищі)

Хід роботи:

1. 1,5% агар заливають в чашки Петрі по 15-20 мл, висушують (10 чашок).
2. Досліджуваний фаг титрують методом 10-кратних розведень (в 12 пробірок вносять 4,5 мл фіз.розчину та додають 0,5 мл фага в першу пробірку).
3. У пробірки наливають 2-3 мл розплавленого 0,7%-ного агару та охолоджують до 45°C потім додають 1мл бактеріофагу (попередньо розведеного) і 0,2 мл бактеріальної культури. Вміст пробірки ретельно перемішують та виливають в чашки Петрі на нижній агар. Нумерація чашок Петрі з нижнім і пробірок з верхнім агаром відповідає нумерації розведень фага. Ті ж самі висіви проводять із контрольних пробірок на ч. Петрі, які позначають як контроль на ріст бактерій (КК).
4. Після того як верхній шар застиг, чашки Петрі ставлять на інкубацію (в термостат на 18-20 годин при 28°C).
5. Через 18 годин враховують результати. Присутність фагів визначається його здатністю утворювати прозорі негативні колонії.

2. Титрування фага методом Аппельмана на чутливій культурі (у рідкому поживному середовищі)

Хід роботи:

1. У 10 стерильних пробірок вносять по 4,5 мл поживного середовища або фізіологічного розчину. Пробірки ставлять в штатив і нумерують, на 9 пробірці ставлять позначку КК (контроль культури), на 10 - КС (контроль середовища). Всі дослідні пробірки повинні бути підписані. У пробірках під номерами від 1 до 8 готують послідовні десятиразові розведення фага від 10^{-1} до 10^{-8} . У першу пробірку вносять 0,5 мл фага. Замінивши піпетку новою, ретельно перемішують вміст 1-ї пробірки і переносять 0,5 мл його в 2-гу пробірку, 0,5 мл вмісту 2-ї пробірки переносять в 3-тю. Кожен раз необхідно брати нові піпетки (або носики). Перемішавши вміст 8-ї пробірки, 0,5 мл розведення із неї виливають.
2. У всі пробірки досліду, крім пробірки 10 додають по 0,2 мл суспензії тест-культури. Внесення культури проводять однією піпеткою починаючи з пробірки КК.

3. Пробірки ставлять в термостат на 18-20 годин при 28°C, після чого проводять облік результатів титрування, розпочинаючи з контролів.

3. Визначення титру фага за допомогою spot-тесту.

1. Розграфити чашку на 9 секторів.
2. Розлити по 1 чашці Петрі з поживним агаром 1,5%.
3. У пробірку внести 2-3 мл нижнього агару 0,7% (витримувати на водяній бані при 45°C, внести в неї 0,2 мл тест культури та нашарувати на нижній агар.
4. Розкапати в кожний сектор розведення фагу від 10^{-1} до 10^{-8} в об'ємі 5 мкл.

Контрольні питання

1. Які контролі ставлять при визначенні інфекційної активності фагів і для чого вони необхідні?
2. Які переваги методів титрування за Грація та за Аппельманом?
3. Вкажіть титр бактеріофагу T2, якщо були отримані такі результати титрування по Грація: на 6-ій чашці підраховано 134 колонії, на 7-ій чашці підраховано 15 колоній, а на 8-ій – 2 колонії при внесенні фага по 0,5 мл.
4. Титр фагу становить 10^{-9} , вказати за допомогою якого (або яких) методів він був визначений. Опишіть цей метод.
5. В яких випадках не можна визначити титр фага?
6. Назвати можливі варіанти застосування препаратів фагів на практиці.
7. Чому титрувати фаги потрібно в стерильних умовах?

Тема 3. Отримання фаголізатів, методи очистки та концентрації бактеріофагів. Контролі чистоти препаратів.

Для отримання очищених препаратів фагу високого титру необхідно приготувати його у великій кількості за об'ємом та у високому інфекційному титрі.

Для отримання великої кількості фага, в 300 чашок Петрі вносять 1,5% агар. В окрему колбу з 0,7% агаром ($t = 45^{\circ}\text{C}$) вносять бактерії в концентрації $10^7 - 10^8$ кл/мл і фаг в концентрації $10^4 - 10^5$ ф/мл.

Суміш активно перемішують і по 3 мл наносять на чашки з 1,5% агаром. Чашки інкубують протягом доби, а потім в кожну вносять по 5 мл фізіологічного розчину і скляним шпателем обережно знімають верхній шар агару. Знятий агар об'єднують разом, гомогенізують на магнітній мішалці до

однорідного завису. Потім фаголізат центрифугують в режимі низькошвидкісного центрифугування (5 тис. об./хв. на протязі 30 хв). Збирають надосадову рідину, що містить фаг і титрують методом агарових шарів. Чашки Петрі можна замінити культуральними матрацами, в які заливають по 250 мл 1,5%-ного агару, на який нашаровують верхній 0,7%-ний агар з бактеріями та фагом.

Інкубують матраци в горизонтальному стані. Вихід фагу в результаті даного методу культивування значно вищий.

Мета. Ознайомити студентів з теоретичними та практичними способами отримання фаголізатів у рідких та твердих поживних середовищах, концентрації та очистки фагів за допомогою фізичних і хімічних методів, методами диференційного центрифугування та ультрацентрифугування в градієнті щільності, методом висолювання сульфатом амонію, методом гел'фільтрації, методом іонної хроматографії. Визначити міру чистоти препарату вірусу за допомогою методів електронної мікроскопії та спектрофотометрії.

Обладнання. Термостат на 28°C, центрифуга ЦЛР, ультрацентрифуга УЦП-65, спектрофотометр СФ-4 А, електронний мікроскоп ЕМ – 125, ваги для урівноваження препарату.

Матеріали. Бактеріальні культури фітопатогенних бактерій, фаги.

Середовища. Фізіологічний розчин, 0,7 та 1,5 % МПА.

Посуд та інструменти: Пробірки, піпетки, чашки Петрі, центрифужні пробірки, колби.

Хід роботи:

1. Отримання фаголізатів в рідкому поживному середовищі.

1. Бактеріальну культуру вирощують до стадії логарифмічного росту в поживному середовищі в умовах термостата протягом 18-20 год.
2. Коли концентрація бактерій досягне 10^8 кл/мл, внести фаг із множинністю інфекції 1:100 та інкубувати в термостаті при постійній аерації середовища до повного лізису клітин (середовище стає прозорим та на дні колби помітно шар осаду зруйнованих залишків бактерій).
3. Фаг відділити від незруйнованих бактеріальних клітин шляхом низькошвидкісного центрифугуванням при 5000 об/хв протягом 30 хв. Цю процедуру слід проводити терміново, тому що фаг може

адсорбуватись на зруйнованих бактеріях, що приведе до значного зниження концентрації фагу.

4. Надосадову рідину титрують методом агарових шарів.

2. Отримання лізату методом зливного лізису (на твердому поживному середовищі).

1. Нижній 1,5% агар розлити по 30 мл в чашки Петрі. В колбу з 0,7 % агаром розплавленим до 45°C внести добову бактеріальну культуру та фаг із множинною інфекції 1:1. Вміст колби перемішати та нашарувати по 2 мл суміші на кожну чашку з нижнім 1,5% агаром.
2. Чашки інкубують протягом доби.
3. Потім у кожну із них внести по 5 мл фізіологічного розчину, витримати 20 хв і скляним шпателем обережно відшарувати верхній агар від нижнього, перенести його в чисту колбу.
4. Для екстракції фага вміст колби гомогенізують на магнітній мішалці до однорідної маси протягом 30 хв.
5. Гомогенат перенести в центрифужні пробірки, врівноважити і центрифугувати в режимі низько швидкісного центрифугування при 5000 об\хв протягом 30 хв.
6. Надосад відділити від осаду. Отриманий вірус титрувати методом агарових шарів.

Фаг, лізуючи чутливу культуру у верхніх шарах м'якого агару, призводить до утворення суцільного лізису бактеріальних культур. Отриманий фаголізат не придатний для біохімічних досліджень (оскільки може містити домішки сторонніх білків і НК).

Для концентрації та очистки фагів та інших вірусів, як правило, використовують великі об'єми фаголізату – 5-10 л з титром 10^9 - 10^{10} ф/мл. Фаг концентрують у 50-100 разів по відношенню до вихідного об'єму.

При очистці вірус звільняють від компонентів поживного середовища, залишків зруйнованих бактерій та продуктів їх життєдіяльності. Для цього використовують фізичні та хімічні методи.

3. Диференційне центрифугування

1. Низькошвидкісне центрифугування проводять при 5 тис. об\хв протягом 30хв.

2. Після центрифугування надосадову рідину обережно зливають в стакан, а осад (бактеріальні клітини та їх компоненти) переносять у дезінфекційний розчин.
3. Високошвидкісне центрифугування проводять при 30000 об\хв протягом 120 хв при температурі 4°C.
4. Після центрифугування надосадову рідину видаляють, а фаг у вигляді осаду на дні пробірки ресуспендують у мінімальній кількості буферу чи фізрозчину.
5. Фаг знову піддають низькошвидкісному центрифугуванню для усунення забруднень. Описана процедура являє собою один цикл диференційного центрифугування. Як правило, проводять два-три диференційних цикли.
6. Для підвищення виходу фага осад, отриманий після першого циклу, збирають, екстрагують в невеликій кількості розчину і екстракт додають до неочищеного концентрату при виділенні наступної порції фагу.
7. Очищений фаг має вигляд гомогенної, опалесцеючої та в'язкої суспензії. Титри його становлять 10^{12} - 10^{13} ф/мл. Вихід фагу при такому способі отримання становить 30-60% від вихідної кількості вірусу.
8. Титрують отриманий фаг за методом агарових шарів.
9. Порівнюють титри вірусних препаратів із фаголізату та після концентрування.

4. Осадження фагу сульфатом амонію.

1. Для концентрування фагів використовують сіль сірчанокислового амонію в сухому вигляді. Сіль вносять до тих пір, поки не відбудеться повне насичення фаголізату нею. До препарату фаголізату поступово, невеликими порціями додають суху сіль сірчанокислового амонію з розрахунку 25 г на 100 мл суспензії.
2. Лізат з $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ витримують протягом ночі при 4°C. Осад випадає протягом 20 год при температурі 4°C на холоді.
3. Відокремлюють осад центрифугуванням при 5000 об\хв.
4. Осад ресуспендують 0,1М трисом та діалізують проти фізіологічного розчину протягом доби або (проти 0,01М трис - HCl буферу, рН 7,2 – 7,4).
5. Титрують отриманий фаг за методом агарових шарів. Враховують результати.

5. Ультрацентрифугування в градієнті густини.

Даний метод забезпечує більш високу очистку препарату фага порівняно з методом диференціального центрифугування. Для створення градієнта густини використовують CsCl, сахарозу.

1. Метод виконується в градієнті густини сахарози. В целулоїдні пробірки місткістю 5 мл внести по 1 мл 40%, 30%, 20% та 10% сахарози і нашарувати на її поверхню по 1 мл фагової суспензії з інфекційним титром 10^{12} БУО\мл.
2. Центрифугувати при 30000 об\хв протягом 120 хв.
3. Наявність концентрованого та очищеного вірусу виявляють за появою зони опалесценції.
4. Відбирають фракції вірусу. Від сахарози позбавляються шляхом діалізу фракцій вірусу проти буферного розчину протягом 6-12 год при температурі 4°C.
5. Фракції титрують методом агарових шарів.

Контролі чистоти препарату фага.

Отриманий препарат концентрованого та очищеного вірусу має бути перевірений на чистоту. Цим визначається ступінь гомогенності та монодисперсності вірусних суспензій. Гомогенний вірусний препарат – це препарат, що складається із частинок однорідних за розміром, формі, електрофоретичній рухливості, густині та за антигенними властивостями. Всі ці критерії лежать в основі методів, які дозволяють контролювати чистоту вірусних препаратів.

1. Електронно-мікроскопічний контроль.
2. Спектрофотометричне дослідження.
3. Метод електрофорезу.
4. Метод аналітичного ультрацентрифугування
5. Імунологічні та імунохімічні методи

Контрольні питання

1. Дати характеристику найбільш ефективним методам отримання фаголізатів.
2. Назвіть критерії чистоти вірусних препаратів.
3. Дайте характеристику основних методів концентрації та очистки фагів.
4. Принцип диференційного центрифугування.
5. В чому полягає суть методу висолювання сульфатом амонію?
6. Запропонуйте свої схеми очистки і концентрації вірусів.

Тема 4. Вивчення основних параметрів інфекційного процесу фага (визначення константи швидкості адсорбції фага, визначення спектра літичної дії фага)

Мета. Ознайомитися з основними параметрами інфекційного процесу фага та визначити константу швидкості адсорбції фага на бактеріальній культурі та спектр літичної активності фагів відносно різних штамів бактерій родів *Pseudomonas*, *Erwinia* та *Xhantomonas*.

Обладнання. Термостат на 28°C, термометр, водяна баня.

Матеріали. Бактеріальні культури фітопатогенних бактерій, фаги.

Середовища. Фізіологічний розчин, 0,7 та 1,5 % МПА.

Посуд та інструменти: пробірки, піпетки, чашки Петрі.

Хід роботи:

1. Визначити константу швидкості адсорбції фага на бактерії за числом не адсорбованого фага.
2. Приготувати адсорбційну суміш з 0,5 мл культури та 0,5 мл фага.
3. Інкубувати отриману суміш при 28°C та відбирати по 0,1 мл через 5 та 15 хв і внести в 9,9 мл охолодженого фізіологічного розчину (для швидкого припинення процесу адсорбції).
4. Розведену суміш центрифугують 5 хв при 3000 об/хв.
5. Надосадову рідину з неадсорбованим фагом титрують методом агарових шарів від 10^{-1} до 10^{-8} .
6. Надосадову рідину з неадсорбованим фагом висіваємо на Ч.Петрі (1 мл проби та 0,2 мл культури вносимо в 2-3-мл верхнього агару). Висіваємо лише з пробірок з розведенням 10^{-6} до 10^{-8} .
7. Інкубувати при температурі 28°C!
8. Визначити число вільного неадсорбованого фага (порахувати кількість негативних колоній і помножити на розведення вірусу).

Вирахувати константу швидкості адсорбції за формулою:

$$K = 2,3 \lg(P_0/P)/Vt,$$

P_0 – вихідна кількість фага, P – кількість неадсорбованого фага, t -час адсорбції, Vt - кількість бактеріальних клітин.

9. Визначити відсоток адсорбованого фагу за час адсорбції.

Визначення спектра літичної активності фага по відношенню до штамів бактерій різних родів

1. Культури висіяні на 1,5% агарі, розподілити рівномірно на поверхні агару.

2. 1 мл фага в тест-розведенні 10^6 БУО\мл внести в 0,7% агар, розплавлений до 45°C , обережно перемішати і нашарувати на нижній агар з культурою.
3. Після 18 год інкубації при температурі 28°C визначити спектр літичної дії фага відносно досліджуваних культур за наявністю негативних колоній або зони суцільного лізису.

Контрольні питання

1. За допомогою яких методів визначається константа швидкості адсорбції фага?
2. Яка мета визначення спектру літичної активності
3. Вкажіть титр бактеріофагу, якщо були отримані наступні результати титрування за Грація: на 5-ій чашці підраховано 144 колонії, на 6-ій чашці підраховано 28 колоній, а на 7-ій – 2 колонії при внесенні фага по 1 мл.

Тема 5. Методи вивчення чутливості фагів до дії фізичних та хімічних факторів

З якою метою вивчають чутливість фагів:

- для вивчення біологічних властивостей вірусу
- чутливість є показником, що входить до таксономічних ознак.
- вивчення порогової мутаційної та летальної дози У/Ф опромінення
- фаг – тест система при вивченні дії різних факторів
- для вивчення тонкої структури, організації вірусів та встановлення деталей будови.

Фактори бувають за природою фізичні та хімічні. Механізм дії фактора залежить від природи і структури на яку діє фактор.

З хімічних факторів: барвники, антибіотики, водневий показник. Їх дія пов'язана з білковими структурами вірусів. Вплив факторів призводить до денатурації білків, пошкодження структури віріона (рецепторів).

В нуклеїновій кислоті фактори можуть призводити до таких типів пошкоджень:

- вставки та випадіння нуклеотидів;
- хімічні зміни в окремих нуклеотидах;
- зшивки азотистих основ, які спостерігаються в одній з ниток і між нитками
- зшивки між молекулами білка та нуклеїнової кислоти.

Акридинові барвники (профлавін) утворює комплекс з ДНК, в результаті цього утворюється молекула ДНК, в якій випала або добавилась

певна пара нуклеотидів і при цьому виникає ефект зсуву рамки зчитування генетичної інформації.

Антибіотики стримують процес розвитку вірусної інфекції. *Ріфампіцин* - його синтетичне похідне призводить до специфічного інгібування синтезу і-РНК. В результаті цього не відбувається синтезу вірусних білків. *Актиноміцин Д* – в процесі взаємодії з вірусом вступає в зв'язок з 2-во спіралізованою ДНК. Антибіотик закриває ДНК від полімераз і забороняє доступ, які синтезують і-РНК.

Хімічні речовини – сечовина, додецил сульфат натрію (ДДС), розривають водневі зв'язки в ДНК.

Сечовина призводить до скорочення чохла хвостового відростка, достроковий вихід нуклеїнової кислоти, руйнування структури конектора, діє на білки і рецептори.

ДДС сприяє руйнуванню третинної структури білка, що призводить до деформації зовнішньої оболонки, капсиду і хвостового відростку, роз'єднує капсид від хвостового відростку, повне руйнування білкової оболонки.

Зниження температури до низькозаморожувальної температури (-70) не впливає на структуру вірусу, відтаювання і багаторазове заморожування призводить до розривів в структурі фага (відрив хвостового відростку від головки).

Вплив рН

зміна рН від 4-8 не впливає на структуру вірусу. Деградація починається від 10.0 рН.

При **10 рН** у фага Т2 спостерігається незначний розрив капсиду з виходом НК в середовище.

рН **10,5** – спостерігається відділення відростку від капсиду і вихід НК.

рН **11** – чохол хвостового відростка переходить в скорочений стан

рН **11, 5** – відділяється базальна пластинка, нитки від зубців, і базальна пластинка набуває форми 6-кінцевої зірки.

рН **12** - призводить до повного розплітання чохла, відшарування його від стержня, він знаходиться в середовищі у вигляді спіралі.

рН **12,5** – руйнування зв'язків, які утримують чохол та стержень, їх розшарування, появляються окремі субодиниці білка стержня. Подібні зміни в структурі фагу спостерігають за допомогою метода електронної мікроскопії.

Мета. Ознайомити студентів із факторами фізичної та хімічної природи і чутливістю до них фагів. В усіх випадках визначити константу швидкості інактивації фагів.

Обладнання. Термостат на 28°C, термометр, водяна баня, рН-метр, джерело ультрафіолетового опромінення.

Матеріали. Бактеріальні культури фітопатогенних бактерій, фаги.

Середовища. Фізіологічний розчин, 0,7 та 1,5 % МПА.

Посуд та інструменти: Пробірки, піпетки, чашки Петрі, хімічні склянки.

Хід роботи:

1. Температурна інактивація.

1. Досліджуваний бактеріофаг розтитрувати до 10^{-5} та 10^{-6} (у пробірках) та поставити на водяну баню на 20 хв (60°C).

2. З кожної пробірки взяти по 0,1 мл зразку та додати 0,9 мл. фіз. розчину.

3. З кожної пробірки взяти по 1 мл і висіяти методом подвійних агарових шарів. Паралельно поставити контроль.

4. Після інкубації визначити константу швидкості інактивації фага за формулою:

$$K = 2,31g(P_0/P_t)/t,$$

P_0 – вихідний титр фагу, P_t – титр фага після інактивації, t – час інактивації.

2. Інактивація фагу розчинами, що мають різні рН.

1. У пробірки з 1,8 мл розчинів з рН4 та рН10 додати по 0,2мл фага з титром 10^{-5} та 10^{-6} ф/мл (відповідно) і через 15 хв після початку досліду із кожної пробірки відібрати по 0,1мл і внести в 0,9мл охолодженого фіз.розчину (епендорф).

2. З кожної пробірки взяти по 1 мл і висіяти методом подвійних агарових шарів. Паралельно поставити контроль.

3. Після інкубації визначити константу швидкості інактивації фага за формулою:

$$K = 2,31g(P_0/P_t)/t,$$

P_0 – вихідний титр фагу, P_t – титр фага після інактивації, t – час інактивації.

3. Інактивація фагу хімічними сполуками.

1. У дві пробірки з 1,8 мл розчинів №1 по 0,2мл фага з 10^{-5} та 10^{-6} ф/мл і через 20 хв після початку досліду із кожної пробірки відібрати по 0,1мл і внести в 0,9 мл охолодженого фіз.розчину (епендорф).

2. З кожної пробірки взяти по 1 мл і висіяти методом подвійних агарових шарів. Паралельно поставити контроль.

3. Після інкубації визначити константу швидкості інактивації фага за формулою:

$$K = 2,31g(P_0/P_t)/t,$$

P_0 – вихідний титр фагу, P_t – титр фага після інактивації, t – час інактивації.

Контрольні питання:

1. Чим зумовлена необхідність вивчення дії фізико-хімічних факторів на фаги?
2. Чи впливає зниження температури до низькозаморозувальної (-70°) на структуру вірусу?
3. Як впливає рН на структуру вірусу.
4. Які фізичні фактори впливають на інактивацію віріона. Механізм дії.
5. Які ви знаєте хімічні сполуки чи речовини, що впливають на віруси мікроорганізмів?
6. Назвіть можливі механізми фотореактивації.

Тема 6. Електронномікроскопічне дослідження морфології віріонів

Мета. Ознайомитися з морфологічними властивостями ізолятів фагів методом трансмісійної електронної мікроскопії.

Обладнання. Електронний мікроскоп.

Матеріали. Концентровані, очищені препарати фагів.

Середовища. Формвар, хлороформ, фосфорновольфрамова кислота.

Посуд та інструменти: Пробірки, піпетки, чашки Петрі, предметне скло.

Хід роботи:

1. Препарати приготувати шляхом негативного контрастування нанесеного на сітку із плівкою вірусного препарату. Для виготовлення плівок використати 0,1–0,2%-ний розчин формвара (полівінілформальдегіда). Як розчинник - хлороформ. Розчин приготувати за добу до використання.
2. Для утворення плівки предметне скло швидко занурити в розчин формвару, через 5 – 10 секунд вийняти й просушити.
3. Отриману плівку підрізати лезом, зняти плівку на воду, повільно опускаючи у воду під кутом 45° .

4. На плівку викласти сітки й зняти їх за допомогою фільтрувального паперу. Сітки з плівкою висушити та зберігати в чашках Петрі.
5. Для приготування електронномікроскопічних препаратів віріонів на сітку з формваровою плівкою-підложкою нанести краплю вірусвмісного матеріалу, витримати 2-3 хвилини, надлишок видалити фільтрувальним папером. Контрастування здійснити 2% розчином фосфорновольфрамової кислоти (ФВК), рН 7,0 або 2 % ураніацетатом, рН 5,6.
6. Електронномікроскопічні дослідження проводити на мікроскопі ЕМ – 125 при напрузі 60 кіловольт та інструментальному збільшенні 25000 - 40 000.

Контрольні питання

1. З якою метою роблять електронно-мікроскопічний контроль?
2. Суть негативного контрастування та позитивного.
3. Які існують контролю чистоти вірусних препаратів?

Тема 7. Вивчення лізогенії в бактерій

Мета. Ознайомити студентів з основними методами виділення лізогенних культур і дослідити їх властивості. Прищепити навички роботи з встановлення справжньої лізогенії в бактерій, отримання нелізогенного варіанта з лізогенного штаму, експериментально лізогенізувати бактеріальні культури, навчити застосовувати різні фізичні та хімічні методи для індукції лізогенних культур, виділення з них помірних фагів для типування бактеріальних культур.

Обладнання. Термостат на 28°C, ультрафіолетова лампа БУЗ-15 (30), центрифуга ЦЛР, бактеріологічна петля.

Матеріали. Бактеріальні культури, фаг.

Середовища. Фізіологічний розчин, МПА 0,7% - 1,5% МПА

Посуд та інструменти: Пробірки, піпетки, чашки Петрі, плоскодонні колбочки, шпателі.

Хід роботи:

1. Виділення лізогенних культур.

Досліджувані культури виростити в пробірках до стадії логарифмічного росту. Потім розділити їх на дві групи, одну досліджувати як індикаторну, а іншу – як лізогенну.

Індикаторні культури нанести петлею в чашку Петрі у вигляді штрихів розміром 1х6 см.

На штрихи нанесіть культуральні рідини штамів, що досліджуються на лізогенність таким чином, щоб крапля поширилася на всю довжину штриха.

Культури інкубувати протягом доби. Якщо з'явилися негативні колонії, то це свідчить про виявлення лізогенної культури.

2. Індукція лізогенних культур.

Культури в логарифмічній стадії росту внести по 5 мл в чашку Петрі та опромінити УФ-променями протягом 20 хв.

Культивувати їх в умовах термостата протягом наступних 3 год, потім відцентрифугувати при 3000 об/хв протягом 20 хв.

Надосадову рідину кожної з опромінених культур дослідити на лізогенність за методом нашарування на газон індикаторної культури. Лізогенність виявляється за наявністю негативних колоній.

3. Отримання штучно-лізогенізованих культур.

До шестигодинної індикаторної культури, яка росла в рідкому поживному середовищі, внести дослідний помірний фаг та інкубувати в умовах термостата впродовж доби.

Фаголізат відцентрифугувати. Надосад видалити, а осад (бактерії) – розсіяти петлею в чашку Петрі з агаром для одержання ізольованих колоній бактерій.

Отримані колонії дослідити на чутливість до помірного фага та на лізогенність. Якщо лізогенізація культури відбулася, то доказом цього буде нечутливість культури до цього помірного фага та відсутність негативних колоній.

Лізогенізовану культуру пасирувати впродовж п'ятьох пасажів на МПА з метою звільнення від домішок вільного фага.

Отримані результати занести до протоколу й зробити висновок.

Контрольні питання

1. Які бактеріальні культури належать до лізогенних?
2. Які фаги належати до вірулентних та помірних?
3. Яким чином можна отримати лізогенізовану культуру і як це довести?
4. Що таке частота лізогенізації?
5. Як відрізнити справжню вірулентність від несправжньої?
6. Як можна одержати нелізогенну культуру з лізогенної?

ТЕМА 8. Вивчення генетичних взаємозв'язків між фагами

Мета заняття. Ознайомити студентів із можливістю експериментального отримання мутантів фагів при змішаному інфікуванні їх спорідненими дикими фагами, що відрізняються за однією ознакою. Прищепити студентам навички зі створення рекомбінантних фагів.

Обладнання. Термостат на 28°C, водяна баня, термометр. Стерильний посуд. Чашки Петрі - 10 шт., піпетки 1-2 мл - 20 шт., 5-10 мл - 2 шт., пробірки - 20 шт. Стерильні середовища. Амінопептид -100 мл, 0,7%- та 1,5%-й МПА - 50 та 100 мл, фізіологічний розчин -100 мл.

Матеріали. Бактеріальна культура клітин, резистентні та чутливі штами бактеріальних культур роду *Pseudomonas*, фаги, антифагова сироватка.

Хід роботи

1. Отримати h та r мутантів фага.

1.1. Фаг висіяти за методом агарових шарів у чашку Петрі з резистентною культурою, інкубувати 18 год, спостерігаючи за утворенням негативних колоній.

1.2. Отримані негативні колонії перенести в пробірку з 5 мл АПС з резистентною культурою, виділити негативні колонії, одержати чисту культуру, пасируючи їх на культурах у рідких та твердих поживних середовищах. Репродукція виділеного фага на резистентній культурі свідчить про виділення h-мутанта фага.

1.3. Фаг висіяти за методом агарових шарів на чутливих культурах у різних поживних середовищах.

1.4. Після інкубації визначити утворення незвичних негативних колоній.

1.5. Відколоти колонії і пасирувати їх протягом п'ятьох пасажів на чутливій культурі в рідкому та твердому середовищах. Якщо морфологія колоній зберігається, то такий фаг слід вважати за r-мутант.

2. Змішане інфікування бактеріальної культури двома фагами.

2.1. Приготувати в пробірці суміш двох фагів з однаковою концентрацією (10^7 ф/мл).

2.2. Суміш фагів із множиною інфекції 10:1 додати до чутливої культури, що знаходиться в стадії логарифмічного розвитку, інкубувати протягом 10 хв.

2.3. Вільний неадсорбований фаг нейтралізувати специфічною сироваткою, яка береться в такому розведенні, щоб за 5 хв нейтралізувати вільний фаг.

2.4. Суміш розвести, процентрифугувати, зробити осад хлороформом і висіяти за методом агарових шарів на таких індикаторних культурах:

а) чутлива до обох фагів, б) стійка до одного з фагів, в) стійка до іншого фага, г) стійка до обох фагів.

2.5. Усі висіви інкубувати і після 18 год підрахувати кількість негативних колоній того та іншого фагів на різних індикаторних культурах. Виявити наявність та відсутність взаємного виключення у даної пари фагів.

3. Отримання та вивчення рекомбінантів фага.

3.1. Бактеріальний штам інфікувати сумішню фагів, що різняться за морфологією негативних колоній (прозорі та з мутним ореолом).

3.2. Інкубувати суміш "фаг+бактерія" протягом 10 хв, вільний фаг видалити антифаговою сироваткою.

3.3. Суміш центрифугувати, обробити хлороформом і висіяти на суміш індикаторних культур. На газонах культур повинні утворитись чотири типи негативних колоній.

3.4. Описати їх морфологію.

3.5. Відзначити відсоток утворених рекомбінантів за такою формулою:

$(2a \times 100) / n$,

де a — число рекомбінантів дикого типу, $2a$ — число рекомбінантів обох типів, n — загальне число потомства фага.

4. Вивчення явища трансдукції. Трансдукція — це перенесення властивостей від одного бактеріального штаму до іншого за допомогою фагів.

4.1. Два штами помірного фага (кожний окремо) пасирувати на культурі штаму-донора і культурі реципієнта.

4.2. Кожним із цих фагів заразити клітини бактерій-реципієнтів та інкубувати при температурі 28 °C до закінчення латентного періоду розвитку (20-25 хв).

4.3.1 мл суміші висіяти за методом агарових шарів на індикаторній культурі з різними маркерами. У випадку стійкості культури до антибіотика (стрептоміцин) висіяти суміш у чашку Петрі зі стрептоміцином; у випадку маркера ферментативної активності — висіяти в чашку з вуглеводневим або іншими індикаторами.

4.4. Після 18 год інкубації відмітити появу бактеріальних колоній за такими ознаками: зміна забарвлення, ріст бактерій у присутності антибіотика.

4.5. Визначити частоту трансдукції.

4.6. Отримані результати внести до протоколу та зробити висновок.

Контрольні питання

1. Які генетичні дослідження можна проводити на моделі „фаг-бактерія“?
2. Як за допомогою рекомбінантів можна визначити місце розташування генетичних локусів на хромосомі бактеріофагу?
3. Перерахуйте можливі методи відбору мутантів фага.
4. Яким чином можна індукувати мутації у фагів?
5. Назвіть типи трансдукції, яке їх практичне значення?

ТЕМА 9. Вивчення лізогенії в бактерій

Мета заняття. Ознайомити студентів з основними методами виділення лізогенних культур і дослідити їх властивості. Прищепити навички роботи з встановлення справжньої лізогенії в бактерій, отримання нелізогенного варіанта з лізогенного штаму, експериментально лізогенізувати бактеріальні культури, навчити застосовувати різні фізичні та хімічні методи для індукції лізогенних культур, виділення з них помірних фагів для типування бактеріальних культур.

Обладнання. Термостат на 28 °С, ультрафіолетова лампа БУЗ-15 (30), центрифуга ЦЛР, бактеріологічна петля. Стерильний посуд. Чашки Петрі — 10 шт., пробірки — 21 шт., піпетки - 12 шт., плоскодонні колбочки — 10 шт., фільтр Зейтца, шпателі. Стерильні середовища. АПС — 100 мл, 0,7%- та 1,5%-й МПА по 50 та 100 мл, фізіологічний розчин — 100 мл.

Матеріали. Бактеріальні культури роду *Pseudomonas* — 10 штамів, помірний фаг.

Хід роботи

1. Виділення лізогенних культур.

- 1.1. Досліджувані культури виростити в пробірках з АПС до стадії логарифмічного росту. Потім розділити їх на дві групи, одну досліджувати як індикаторну, а іншу — як лізогенну.
- 1.2. Індикаторні культури нанести петлею в чашку Петрі у вигляді штрихів розміром 1^х6 см.
- 1.3. На штрихи нанести культуральні рідини штамів, що досліджуються на лізогенність таким чином, щоб крапля поширилася на всю довжину штриха.
- 1.4. Культури інкубувати протягом доби. Якщо з'явилися негативні колонії, то це свідчить про виявлення лізогенної культури.

2. Індукція лізогенних культур.

- 2.1. Культури в логарифмічній стадії росту внести по 5 мл в чашку Петрі та опромінити УФ-променями протягом 20 хв.
- 2.2. Культивувати їх в умовах термостата протягом наступних 3 год, потім відцентрифугувати при 3000 об/хв протягом 20 хв.
- 2.3. Надосадову рідину кожної з опромінених культур дослідити на лізогенність за методом нашарування на газон індикаторної культури. Лізогенність виявляється за наявністю негативних колоній.

3. Отримання штучно-лізогенізованих культур.

- 3.1. До шестигодинної індикаторної культури, яка росла в рідкому поживному середовищі, внести дослідний помірний фаг та інкубувати

в умовах термостата впродовж доби.

- 3.2. Фаголізат відцентрифугувати. Надосад видалити, а осад (бактерії) — розсіяти петлею в чашку Петрі з агаром для одержання ізольованих колоній бактерій.
- 3.3. Отримані колонії дослідити на чутливість до помірної фага та на лізогенність. Якщо лізогенізація культури відбулася, то доказом цього буде нечутливість культури до цього помірної фага та відсутність негативних колоній.
- 3.4. Лізогенізовану культуру пасирувати впродовж п'ятих пасажів на МПА з метою звільнення від домішок вільного фага.
- 3.5. Отримані результати занести до протоколу й зробити висновок.

Контрольні питання

1. Які бактеріальні культури належать до лізогенних?
2. Перерахувати відомі методи відбору лізогенних та індикаторних культур.
3. Які фаги належать до вірулентних та помірних?
4. Як відрізнити справжню вірулентність від несправжньої?
5. Назвати механізми дії індукуючих факторів та методи індукції.
6. Як можна одержати нелізогенну культуру з лізогенної?
7. Яким чином можна отримати лізогенізовану культуру і як це довести?
8. Що таке частота лізогенізації?

ТЕМА 10. Методи вивчення поліпептидного складу білків фага (електрофорез у поліакриламідному гелі). Визначення молекулярної маси вірусних білків

Мета заняття. Ознайомити студентів із теоретичними основами фракціонування білків у поліакриламідному гелі (ПААГ) за методом диск-електрофорезу (за Леммлі), прищепити навички постановки експерименту з визначення поліпептидного складу білків фага та визначення молекулярної маси фракціонованих білків.

Обладнання. Прилад для електрофорезу, блок живлення ПЕФА-1, рН-метр, фільтрувальний папір, термометр, водяна баня, піпетки (1, 2, 5, 10 мл) - 10 шт., пробірки - 12 шт., автоматичні піпетки (20, 100 мкл), гумові рукавички, лінійки, міліметровий папір.

Розчини для диск-електрофорезу (за Леммлі)

№ 1. Концентрований розчин поліакриламід (ПАА): на 80 мл	на 100 мл
акриламід (АА) 23,4 г	29,2 г
бісакриламід (БАА) 0,62 г	0,8 г

№ 2. Тріс-НСІ буфер, 1,4 М, рН 8,8, (концентрований розчин):

Тріс — 42,4 г
НСІ — до рН 8,8
Н₂О — до 250 мл

№ 3. Тріс-НСІ буфер, 0,5 М, рН 6,3 (концентрований розчин):

Тріс — 15,1 г
НСІ — до рН 6,8
Н₂О — до 250 мл

№ 4. Додецилсульфат Na(SDS) 10%-й розчин: 1 г на 10 мл.

№ 5. Персульфат амонію (ПСА): 100 мг/мл

№ 6. Електродний буфер рН 8,3: одноразовий розчин (1800 мл)

0,025 М Тріс 5,4 г
0,192 М гліцин 25,92 г
1%-й SDS 1,8 г

№ 7. Буфер зразку рН 6,8 (4-х кр. 1:3) на 5 мл

0,5 М Тріс-НСІ буфер, рН 6,8 2,5 г
SDS 400 мг
Гліцерин 2,0 мг
2-меркаптоетанол 400 мкл
Н₂О 100 мкл
бромфеноловий синій 50 мкг

Розділяючий гель:

	10%	14%
АА-БАА/№1/	13.4 мл	18.76 мл
Тріс-НСІ рН 8,8 /№ 2/	10,0 мл	10.0 мл
10%-й SDS /№ 4/	0.4 мл	0.4 мл
ПСА/№5/	0.134	0.134 мл
Н ₂ О	17.4 мл	12.0 мл

дегазація+ТЕМЕД /- 5 мкл/

Стартовий (концентруючий гель): 3%-й 5%-й

АА-БАА/№1/	1.0 мл	1.7 мл
Тріс-НСІ рН 6,8 /№ 3/	2,5 мл	2,5 мл
10%-й SDS/№4/	0.1 мл	0.1 мл
ПСА/№3/	0.1 мл	0.1 мл
Н ₂ О	6.3 мл	5.6 мл

дегазація+1 ТЕМЕД-7 мкл/

Для обробки гелів після електрофорезу:

а) для фіксації гелів: 10%-на трихлороцтова кислота (ТХО);

б) для фіксації та консервування: метиловий спирт — льодяна оцтова кислота — вода у співвідношенні 5:1:5; 82

в) для забарвлення: 0,1 %-й розчин Coomassie Brilliant Blue - 250 у розчині для фіксації та консервування;

г) для відмивки: спирт етиловий перегнаний, оцтова кислота, вода у співвідношенні 5:1:5.

Білки-маркери: альбумін (Мм 67 к, D), овал фосфорилаза (Мм 94 к, D), карбонат ангідраза (Мм 30 к, D), інгібітор трипсину (Мм 20,1 к, D), лактальбумін (Мм 14,4 к, D) (Pharmacia). Або маркери - стандартний набір Sigma VII L (66; 45; 36; 29; 24; 20,1 та 14,2 кДа).

Хід роботи

1. Приготувати всі розчини та буфери.
2. Зібрати комірку приладу для електрофорезу.
3. Приготувати розділяючий гель. Внести в комірку за допомогою піпетки розділяючий гель на 2 см нижче верхнього зрізу скляної пластинки, для рівномірної полімеризації поверхні нашарувати над гелем ізобутиловий спирт або H_2O . Після полімеризації видалити над гелем за допомогою фільтрувального паперу та промити дистильованою водою. Приготувати та внести й терміново вставити гребінку. Після полімеризації акуратно видалити гребінку та просушити фільтрувальним папером.
4. Вставити комірку в прилад для електрофорезу, налити електрофорезний буфер на 2 мм вище краю скляної пластинки.
5. Розвести фаг у потрібному об'ємі буфера для препарату (3 частини фага: 1 частина буфера, v/v).
6. Пробірки з препаратом кип'ятити у водяній бані 3 хв. Швидко охолодити під проточною водою.
7. За допомогою автоматичної піпетки нанести по 40 мкл препарату в лунки гелю.
8. Терміново ввімкнути струм, щоб запобігти дифузії препарату. При розділенні білків у присутності ДДС-Na усі білки йдуть від „—” до „+”.
9. Провести електрофорез білків.

Перший етап: до входження лідуєчого барвника в розділяючий гель - напруга джерела струму 60-80 V.

Другий етап: напруга джерела струму в розділяючому буфері — 180-200 V.

Електрофорез вважається закінченим, коли лідуєчий барвник досягне нижнього зрізу скляних пластинок.

10. Вимкнути струм, злити електрофорезний буфер, розібрати прилад та комірку й обережно перенести розділяючий гель у розчин для фіксації та забарвлення.

11. Провести фабування (до рівномірно насиченого синього кольору) і відмити 7%-ою оцтовою кислотою 5-6 разів при температурі 37 °С до повної прозорості гелю.

12. Визначити електрофоретичну рухомість білків фага. Для цього визначають довжину гелю після відмивки й оцінюють відстань, яку пройшов лідуєчий барвник. Електрорухомість білку визначається за формулою:

$$\text{Рухомість} = \frac{\text{відстань, яку пройшла білкова зона, мм}}{\text{довжина гелю після відмивки, мм}} \times \frac{\text{Довжина гелю після закінчення форецу, мм}}{\text{відстань, яку пройшов лідуєчий барвник після закінчення форецу, мм}}$$

13. Побудувати калібровочну пряму за електрофоретичними рухомостями білків-маркерів. Визначити молекулярну масу поліпептидів фага. При побудові калібровочної прямої на осі абсцис відкладають величину рухомості білків-маркерів (мм), а на осі ординат — десятичний логарифм молекулярної маси даного білка. За величиною рухомості невідомого білка та побудованою калібровочною прямою визначають молекулярну масу невідомого білка.

14. Визначити молекулярну масу поліпептидів фага за допомогою комп'ютерної програми. Обробку результатів провести за допомогою програми TotalLab from foretics v.2.0 (NonlinearDynamics Ltd). Для статистичної обробки отриманих даних використовують програмне забезпечення Microsoft®Excel 2002, зокрема інструменти аналізу даних – «Описову статистику».

15. Порівняти дані, отримані самостійним визначенням та за допомогою ПК.

Контрольні питання

1. Як правильно підібрати концентрації АА і БАА (С і Т) для якісного розділення білків?
2. Назвати послідовність подій у полімеризації гелю та роль кожного

- реагенту.
3. Назвати послідовність подій при отриманні поліпептидів та роль SDS, β -меркаптоетанолу та температури.
 4. Перерахувати принципи та переваги методу диск-електрофорезу порівняно з іншими модифікаціями електрофорезу білків. Які, на ваш погляд, недоліки має цей метод?
 5. Визначаючи молекулярну масу білка за допомогою диск електрофорезу за Леммлі, дослідник стикається з низкою труднощів. Що це за труднощі та як із ними боротися?

ТЕМА 11. Методи виділення нуклеїнових кислот та дослідження їх властивостей (визначення типу нуклеїнової кислоти, концентрації, нативності)

Мета заняття. Ознайомити студентів з основними методами виділення нуклеїнових кислот фагів, дати їм навички застосування методу фенольної депротейнізації, навчити визначати тип нуклеїнової кислоти та основні її характеристики: концентрацію, чистоту, нативність.

Обладнання. Термостат на 37 °С, рефрижераторна центрифуга типу ЦРЛ-1, спектрофотометр СФ-24, шутель-апарат, магнітна мішалка, льодова баня, водяна баня.

Стерильний та хімічно чистий посуд: колби круглодонні — 24 шт., склянки — 4 шт., мірна лійка (зі шліфами) — 1 шт., піпетки з оплавленими кінцями — 2 шт., скляні палички — 2 шт., піпетки (1-2 мл) — 20 шт., гумові рукавички, гумові груші.

Реактиви та матеріали. Свіжеперегнаний фенол, етиловий ефір, етиловий спирт, хлороформ, 0,1 М Тріс-буфер, рН 7,0, 0,15 М NaCl, 1N NaOH ЕДТА, проназа або протеїназа К (Sigma), ДДСNa — 20%. Фаг із титром 5×10^8 ф/мл, культура бактеріальних клітин, лізоцим.

Хід роботи:

1. Позбутися хлористого цезію з препарату очищеного бактеріофага за допомогою діалізу при кімнатній температурі протягом 1 год проти 1000-кратного об'єму буфера такого складу: 10 мМ NaCl, 50 мМ трис-NaCl, рН8,0, 10 мМ MgCl₂.

2. Перенести діалізний мішечок у посуд зі свіжим буфером та діалізувати ще впродовж години.
3. Перенести суспензію бактеріофага в центрифужну пробірку такого об'єму, щоб вона заповнилася лише на третину.
4. Додати ЕДТА (0,5 М, рН 8,0) до кінцевої концентрації 20 мМ.
5. Додати проназу до кінцевої концентрації 0,5 мг/мл або протеїнкіназу К до кінцевої концентрації 50 мкг/мл.
6. Додати ДДСNa (основний водний розчин, 20% за об'ємом) до кінцевої концентрації 0,5%. Перемішати суміш, декілька разів перевернувши пробірку.
7. Проінкубувати препарат 1 год при температурі 37°C (у разі пронази) або при 65 °C (у разі протеїнкінази К).
8. Додати такий же об'єм насиченого буфером фенолу. Перемішати вміст пробірки, декілька разів перевернувши її. Розділити фази шляхом центрифугування при 1600 g протягом 5 хв при кімнатній температурі. Перенести водну фазу в чисту пробірку за допомогою піпетки із широким носиком.
9. Один раз екстрагувати водну фазу за допомогою суміші насиченого буфером фенолу та хлороформу (50:50).
10. Зібрати водну фазу, як це описано вище, та екстрагувати її один раз рівним об'ємом хлороформу.
11. Перенести водну фазу в діалізний мішечок.
12. Провести діаліз впродовж ночі при температурі 4°C послідовно проти трьох 1000-кратних об'ємів буфера TE (10 мМ трис-НСІ, рН 8,0 та 1 мМ ЕДТА).
13. Внести вміст діалізного мішечка в 10-кратний об'єм охолодженого етилового спирту. ДНК випадає в осад у вигляді тонких білих ниточок.
14. Ниточки ДНК намотати на скляну паличку та розчинити у 0,1 М Трис-буфері, рН 7,0.
15. Перевірити чистоту препарату. Для цього слід 0,5 мл ДНК змішати з 4,5 мл буфера, ретельно перемішати й відібрати проби по 2 мл кожної. Додати до першої 2 мл буфера, до другої — 2 мл 1 N NaOH.
16. Виміряти поглинання проб при 260, 280 та 290 нм на спектрофотометрії СФ-24.
17. Визначити характеристики препарату ДНК: концентрацію, чистоту, міру нативності: концентрація — при концентрації 1 мкг/мл ДНК, що вимірюється при 260 нм, має поглинання, яке дорівнює 0,02 оптичних одиниці; чистота — чистий препарат ДНК прийнято вважати таким тоді, коли відношення поглинання препарату при E260 до E280 дорівнює або

більше 1,85 оптичних одиниць, препарат ДНК вільний від фенолу, поглинання, його при E290 з лугом і без нього однакове. Якщо ж це поглинання збільшується, то це свідчить про те, що фенол не повністю видалений із ДНК. У цьому випадку необхідно провести 2-3 екстракції ефіром і повторите виміри; міра нативності — виміряти поглинання препарату ДНК з лугом та без нього при E 260 та визначити його співвідношення; якщо воно більше або дорівнює 1,25 оптичних одиниць, то такий препарат ДНК вважається нативним.

Інший метод виділення ДНК:

1. ДНК виділяють методом високотемпературної обробки суспензії фагів розчином ДСН за Девісом, із модифікаціями.

2. Для виділення ДНК при висіві на чашках Петрі, як затверджувач використовують середовища з агарозою. Необхідність використання дорогої агарози пов'язана з тим, що неочищений агар досить інгібує більшість рестрикуючих ендонуклеаз та інших ферментів, які працюють на ДНК. Ця інгібуюча дія може бути зумовлена сульфанованими групами.

3. В охолоджені чашки з утвореним тест – висівом фагів, налити по 5 мл холодного 0,1 М Трис-НСІ буферу. При охолоджені чашок підвищується твердість агарози. Це запобігає суспендуванню агарози при нашаруванні та більш ефективному зливу буферу з чашок на наступному етапі. Залишити чашки на ніч при 4⁰С. Центрифугувати при 5000 g 20 хвилин. З агарозної, як і зі звичайної чашки, отримується 4 мл препарату фагу з титром біля 10¹⁰ БУО/мл. В 0,4 мл такого препарату міститься фагової ДНК стільки, скільки потрібно приблизно на десять треків у гелі. Згідно з методикою по Девісу використовується: 1 мкл диетилоксидиформата, 10 мкл 10%-ного розчину ДСН (додецилсульфату натрію), 50 мкл 2М тріс і 0,2 М Na₂-ЕДТА, 50 мкл 5 М ацетату калію.

4. До 1 мл концентрованої суспензії фагів додати 25 мкл 0,5М ЕДТА, 13 мкл 10%-го розчину ДСН та перемішати. Суміш інкубувати на протязі 5 хвилин при 70⁰ С, для чого використовують водяну баню. За цей час під впливом ДСН відбувалась денатурація білків, що призводило до виділення ДНК із фагових часточок.

5. До утвореної суміші додають 50 мкл насиченого розчину ацетату калію. Це призводить до випадання осаду денатурованих білків із калієвою сіллю додечилсульфату. Проби охолоджують шляхом обкладання їх льодом, щонайменше на 30 хвилин. Охолодження забезпечує повноту преципітації. Ацетат калію додають перед тим, як охолонуть пробірки, в результаті чого

преципітат утворюється повільніше і є дрібнішим. Такі преципітати легше видаляти за допомогою центрифугування.

6. Преципітат осадити центрифугуванням протягом 15 хвилин при 1500g. Якщо частина преципітату при центрифугуванні не сідала на дно, то різко струшують пробірку, щоб видалити захоплене преципітатом повітря, і провести повторне центрифугування.

7. Супернатант злити у нову пробірку. Якщо він виявиться мутним, то проводять повторне центрифугування.

8. Заповнити пробірку з ДНК двома об'ємами етанолу кімнатної температури (20°C). Високомолекулярна ДНК в отриманому препараті легко осаджується етанолом.

9. Центрифугувати протягом 5 хвилин.

10. Надосад злити. Пробірку перевернути і поставити на фільтрувальний папір, для того щоб рідина стекла. Осад розчинити в бідистильованій воді. В ній ДНК легше розчиняється. Потім 10-кратним ТЕ-буфером розчин довести до 1-кратного ТЕ.

Контрольні питання

1. Які ще методи виділення нуклеїнової кислоти вірусів ви знаєте? Перерахуйте їхні недоліки та переваги.
2. Які методи визначення типу нуклеїнової кислоти вірусів ви знаєте?
3. Гіперхромний та гіпохромний ефекти, "плавлення" та "випалювання".
4. Дайте порівняльну характеристику методам визначення нуклеотидного складу нуклеїнових кислот.
5. Особливості будови та складу нуклеїнових кислот вірусів.

ТЕМА 12. Рестрикційний аналіз нуклеїнових кислот бактеріофагів. Визначення молекулярної маси нуклеїнової кислоти та побудова карти рестрикційного аналізу

Мета заняття. Ознайомити студентів із проведенням рестрикційного аналізу і його застосуванням для одержання інформації про нуклеїнові кислоти вірусів, електрофорезу нуклеїнових кислот та дати навички роботи з ферментами – рестриктазами. Навчити визначати молекулярну масу нуклеїнових кислот та будувати карти рестрикційного аналізу.

Обладнання. Термостат на 37°C, прилад для електрофорезу (Vagorhor), блок живлення, мікропробірки фірми "Еппендорф", пастерівські піпетки, автоматичні піпетки 2-20, 20-200 мкл, світлофільтр К-5,6, джерело ультрафіолетового випромінення (ОЛД-41).

Реактиви та матеріали (усі реактиви марки не нижче "ХЧ").

1. Рестриктаза EcoRI, рестриктаза HindIII, нуклеїнова кислота бактеріофага, що вивчається, стандартна ДНК фага λ , розщеплена рестриктазою EcoRI як маркер молекулярної маси (Sigma), бідистильована або деіонізована вода. Розчини для електрофорезу в агарозному гелі.

1. 0,7%-й розчин агарози для електрофореза (Sigma) в електрофорезному буфері.

2. Електрофорезний буфер.

Тріс-борат (ТВЕ) 0,089 М Тріс- 0,089 М борна кислота, 0,002 М ЕДТА (5-кратний маточний буфер): 54 г Тріса, 27,5 г борної кислоти, 20 мл 0,5 М ЕДТА, рН 8,0.

3. Буфер препарату: 0,25 % бромфенолового синього, 40 % (об'єм/вага) сахарози H₂O.

4. Для забарвлення - бромистий етидій у концентрації 0,5 мкг/мл в електрофорезному буфері.

Хід роботи:

1. Проведення розщеплення ДНК фага рестриктазами.

1.1. Додати води до розчину ДНК бактеріофага в стерильній пробірці фірми "Еппендорф" до об'єму 18 мкл та перемішати.

1.2. Додати 2 мкл буфера для рестриктази EcoRI (20 мМ калій-фосфатний буфер рН 7,4, 200 мМ КСІ, 1 мМ ЕДТА, 7 мМ 2-меркаптоетанолу, 10%-го гліцерину, 200 мкг/мл альбуміну) 10-кратної концентрації та перемішати, легко постукуючи по пробірці пальцем.

1.3. Додати 1 одиницю рестриктази EcoRI та перемішати, легко постукуючи пальцем по пробірці. (Одна одиниця ферменту — це кількість ферменту, що необхідна для повного розщеплення 1 мкг ДНК за 1 год у певному буфері та при певній температурі в об'ємі 20 мкл.)

1.4. Повторити дії пунктів 2 і 3 для рестриктази HindIII. Пам'ятати, що фермент швидко інактивується в розведеному вигляді.

1.5. Інкубувати суміш при температурі 37°C протягом 1 год.

1.6. Зупинити реакцію додаванням 0,5 М ЕДТА, рН 7,5 до кінцевої концентрації 10 мМ. Якщо ДНК аналізують одразу з гелі, додати 6 мкл барвника в буфері для нанесення, перемішати суміш струшуванням та внести розщеплену ДНК у гель.

2. Електрофорез ДНК в агарозному гелі.

- 2.1. Додати розраховану кількість порошку агарози у відмірений об'єм електрофорезного буфера.
- 2.2. Нагріти суспензію в бані з киплячою водою або мікрохвильовій печі доти, доки агароза не розчиниться.
- 2.3. Остудити розчин до 50 °С та додати бромистий етидій до кінцевої концентрації 0,5 мкг/мл.
- 2.4. Приклеїти до країв чистої сухої скляної пластинки липку стрічку так, щоб утворилася форма.
- 2.5. Пастерівською піпеткою налити по краях форми невелику кількість розчину агарози.
- 2.6. Коли цей розплав затвердіє, вилити у форму лишок теплого розчину агарози та терміново вставити поряд з одним із кінців гелю гребінку, від зубців якої в гелі лишаться лунки для проб. Необхідно, щоб між дном лунки та основою гелю лишався шар агарози завтовшки 0,5-1,0 мм, тобто щоб дном лунки служив агарозний гель.
- 2.7. Після того, як гель повністю затвердіє (через 30-45 хв) при кімнатній температурі, обережно видалити гребінку й липку стрічку та помістити гель у електрофорезну кювету.
- 2.8. Додати достатню кількість електрофорезного буфера так, щоб гель був покритий шаром буфера завтовшки 1 мм.
- 2.9. Змішати проби з буфером для нанесення проби та внести їх у лунки гелю під електрофорезний буфер.

3. Фіксація та аналіз результатів.

- 3.1. Вимкнути прилад. Обережно (у гумових рукавичках!) перемістити агаровий гель під УФ - світло в темній кімнаті. Завдяки бромистому етидію видно смуги нуклеїнової кислоти.
- 3.2. Закріпивши фотоапарат на штативі, зробити серію знімків із різними експозиціями. З найкращого негативу зробити відбитки.

Розрахувати приблизну величину отриманих фрагментів за стандартними величинами. (ДНК фага λ , що розщеплена рестриктазою EcoRI, дає шість фрагментів: 21226, 7421, 5804, 5643, 4878 та 3530 тп.). Чисельні значення молекулярних мас фрагментів ДНК досліджуваних фагів отримують за допомогою обробки отриманих даних. Для визначення чисельних значень молекулярних мас фрагментів ДНК використовують комп'ютерну обробку отриманих даних. Використовують спеціалізовану програму TotalLab 2.0 from foretics v.2.0 (NonlinearDynamics Ltd). Для статистичної обробки отриманих даних використовують програмне

забезпечення Microsoft®Excel 2002, зокрема інструменти аналізу даних – «Описову статистику».

3.4. За отриманими величинами фрагментів побудувати карту рестрикційного аналізу нуклеїнової кислоти досліджуваного фага.

Контрольні питання

1. Дайте характеристику ферментів-нуклеаз та наведіть приклади їх застосування у вірусології.
2. Порівняйте методи електрофорезу білка (за Леммлі) та нуклеїнової кислоти.
3. Які ще методи визначення молекулярної маси нуклеїнової кислоти, її чистоти та нативності ви знаєте? Порівняйте їх з електрофорезом.
4. Порівняти карти рестрикції з генетичними картами та картами нуклеотидних послідовностей.
5. Що таке кДНК? Принцип полімеразноланцюгової реакції та її застосування у вірусології.

Теми до семінарських занять:

1. Характеристика порядку *Caudovirales*.
2. Характеристика *Lipothrixviridae* (dsDNA)
3. Характеристика *Fuselloviridae* (dsDNA)
4. Характеристика *Plasmaviridae* (dsDNA)
5. Характеристика *Inoviridae* (ssDNA)
6. Характеристика *Cystoviridae* (dsRNA)
7. Характеристика *Leviviridae* (ssRNA)
8. Характеристика *Corticoviridae*
9. Характеристика *Tectiviridae*
10. Характеристика *Microviridae*
11. Характеристика *Rudiviridae* (dsDNA)
12. Характеристика вірусів синьо-зелених водоростей
13. Фітопатогенні бактерії та їх віруси.
14. Актинофаги - віруси мікроскопічних грибів.
15. Плазмиди та фаги, їх взаємовідносини в клітині
16. Мікоплазми та віруси мікоплазм
17. Бактеріоцини та фаги, їх взаємовідносини та біологічна роль.
18. Віруси мікроорганізмів як вектор переносу генетичної інформації.
19. Практичне використання вірусів мікроорганізмів.

Перелік рекомендованої літератури

Основний

1. Атабеков И.Г. Практикум по общей вирусологии. – М., 1981.- с.36-38.
2. Адамс М. Бактериофаги. – М., 1961. – с.406.
3. *Virus taxonomy. Classification and nomenclature of viruses*. Ed. By M.H.V. van Regenmortel- Acad Press.- 2007.- 1147p.
4. Лурия С., Дарнелл Дж., Балтимор Д., Кэмпбелл Э. Общая вирусология. – М.: Мир, 1981.- 680 с.
5. Стент Г., Келиндер Р. Молекулярная генетика. – М.: Мир, 1981.- 648 с.
6. Габрилович И.М. Основы бактериофагии.- Минск, 1973.- 18-56 с.
7. Miller E.S., Kutter E., Mosig G. et al. Bacteriophage T4 genome // *Microbiology and molecular biology reviews*.-2003.- P.86-156.
8. Пташне М. Переключение генов. Регуляция генной активности и фаг λ : Пер. с англ.-М.: Мир, 1989.- 160с.
9. Calendar R.L. *The Bacteriophages*. – Oxford University press. – 2006. - 757 pp.

10. Kutter E., Sulakvelidze A. Bacteriophages: Biology and Applications. – CRC press. – 2004. – 528 p.
11. Остерман Л. А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. Электрофорез и ультрацентрифугирование. - М., 1981. - С. 120-168.

Додатковий

1. Abedon S.T., Troy D. Herschler and D. Stopar. Bacteriophage latent – period evolution as a response to resource availability. // Applied and environmental Microbiology. 2001, V. 67, № 9, - p.4233-4241.
2. Wommack K. Eric and Rita R. Colwell. Virioplankton: Viruses in Aquatic Ecosystems. // Microbiology and Molecular Biology Reviews, March 2000.- Vol. 64, No. 1, p. 69-114.
3. Ackermann Hans – Wolfgang, Stephen Tobias Abedon. Bacteriophage Names.- 2000. - p. 1-30.
4. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование.– М.:Мир - 1984.– с. 430.
5. Самойленко В.И. Современное состояние изучения фагов фитопатогенных бактерий. Бактериальные болезни растений. – М.: Колос, 1981. – с.27-42.
6. Тихоненко А.С. Ультраструктура вирусов бактерий. – М.: Наука, 1968. – с. 178.
7. Flint S.J., Enquist L.W., Krug R.M. Et al. Principles of virology: molecular biology, pathogenesis, and control. - Washington D.C.: ASM Press.- 2000.
8. Miller E.S., Kutter E., Mosig G. Bacteriophage T4 genome \\ microbiology and molecular biology reviews. – 2003. – p.86-156.
9. Льюин Б. Гены. - М., 1987. - С. 8-55.
10. Уотсон Дж. и др. Рекомбинантные ДНК. - М., 1986. - С. 18-56.
11. Практикум по биохимии / Под ред. С. Е. Северина. - М., 1989. - С. 166-183.

**Методичні рекомендації до спецпрактикуму «Віруси мікроорганізмів»
для студентів денної форми навчання ННЦ «Інститут біології»
Київського національного університету імені Тараса Шевченка**

Упорядники: Андрійчук Олена Миколаївна
Шевченко Тетяна Петрівна
Харіна Алла Володимирівна
Поліщук Валерій Петрович

Підписано до друку 31 січня 2011 року