

**КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ТАРАСА  
ШЕВЧЕНКА**

**Методичні рекомендації**

до дисципліни спеціалізації «Молекулярна біологія вірусів»

для студентів денної форми навчання

ННЦ «Інститут біології»

КИЇВ 2015

Методичні рекомендації до дисципліни спеціалізації " «Молекулярна біологія вірусів» для студентів денної форми навчання ННЦ «Інституту біології»/ Київський національний університет імені Тараса Шевченка.- Київ.- Упорядники: Поліщук В.П., Шевченко Т.П.- 2015 – С. 30.

Рецензенти: Матвієнко Н.М.- д.б.н., завідувач відділу іхтіопатології

Інституту рибного господарства НААН

Загородня С.Д. – к.б.н., завідувач лабораторії репродукції вірусів

Інституту мікробіології і вірусології

ім. Д.К. Заболотного НАН України

Затверджено вченою радою

ННЦ «Інститут біології»

протокол №2 від 12 жовтня 2015 року

## Вступ

Мета методичних рекомендацій ознайомити студентів біологічних та медичних спеціальностей з основами молекулярної біології вірусів, сформувавши уявлення про молекулярні механізми етапів розвитку вірусів, ознайомити з генетичним контролем самозбірки вірусних білків та віріонів в клітині та роллю посттранскрипційної модифікації в реалізації генетичної інформації у вірусів, дати студентам уявлення про роль вірусспецифічних білків та ферментів в процесах трансляції вірусів, ознайомити студентів з молекулярно-біологічними аспектами екології та епідеміології вірусів. Перелічено теми, що розкривають загальні риси та відмінності в процесах інтеграції геномів вірусів прокариот та еукаріот, етапи трансляції та специфічні особливості взаємодії вірусних мРНК з рибосомами, механізми та ферментативне забезпечення фузії та пенетрації віріонів, механізми виходу вірусу з клітини та його забезпечення вірусспецифічними та клітинними білками, морфогенез та реплікацію вірусів основних таксономічних груп.

У методичних рекомендаціях наведені основні методи роботи з білками та нуклеїновими кислотами вірусів, запропоновано основні методи виділення та очистки вірусів для молекулярних досліджень та молекулярні методи детекції вірусів рослин.

Для опанування матеріалу по молекулярній біології вірусів у кінці методичних вказівок наведено рекомендований перелік літератури.

## **ТЕМА 1**

### **МЕХАНІЗМИ РЕПЛІКАЦІЇ ГЕНОМІВ ДНК-ВМІСНИХ ВІРУСІВ**

Відмінності в схемах реплікації одно- та дволанцюгових геномів ДНК-вмісних вірусів. Стадії та механізми реплікації олднк вірусів (на прикладі парвовірусів). Реплікативні форми вірусних НК. Реплікаційний цикл бактеріофагу М13. Тонка структура реплікаційної вилки та її специфічні особливості у випадку реплікації геномів дволанцюгових ДНК-вмісних вірусів. Реплікація геномів ДНК-вмісних вірусів за схемою «кільця, що котиться» та «вторинного рулону, що розмотується». Механізм реплікації поліомавірусів. Схема Кернса. Ініціація реплікації у аденовірусів. Реплікація ДНК вірусу простого герпесу. Клітинні та вірусіндуковані ферменти реплікації ДНК вірусів. Особливості реплікації представників родини Рохвірідае (на прикладі вірусу вісповакцини). Реплікація геномів параретровірусів (вірусу гепатиту В та вірусу мозаїки цвітної капусти). Труднощі реплікації 2-х ланцюгових ДНК фагів. Механізми затравки початку реплікації. Стратегії реплікації ДНК вмісних вірусів за Балтімором.

Клас I- Віруси з 2-х ланцюговою ДНК

1. Первинна транскрипція за допомогою ферментів господаря.
2. Трансляція ранніх (регуляторних білків)
3. Реплікація вірусної геномої ДНК (за звичай за допомогою ферментів господаря)
4. Пізня транскрипція ( за звичай опосередкована вірусіними білками)
5. Синтез пізніх (структурних білків)
6. Збірка віріонів.

Клас II Віруси з 1-но ланцюговою ДНК

1. Конверсія у 2-х ланцюгову ДНК.
2. Рання транскрипція (ферменти господаря)
3. Трансляція регуляторних білків та реплікація одноланцюговою ДНК шляхом кільця, що котиться
4. Пізня транскрипція ( за звичай опосередкована вірусіними білками)
5. Синтез пізніх (структурних білків)
6. „Відокремленні” вірусної геномної 1-но ланцюгової ДНК.
7. Збірка віріонів.

## **ТЕМА 2**

### **МЕХАНІЗМИ РЕПЛІКАЦІЇ ГЕНОМІВ РНК-ВМІСНИХ ВІРУСІВ**

Механізм і ферменти реплікації вірусних РНК. РНК-залежні РНК-полімерази – унікальні вірусні ферменти. Загальне й відмінності в механізмах реплікації вірусних РНК-геномів різних типів будови. Раунд реплікації та

проміжні реплікативні форми. Відмінності в раундах реплікації між +РНК-вмісними та –РНК-вмісними вірусами. Важлива роль кінцевих ділянок геному в реплікації вірусних РНК (на прикладах вірусу тютюнової мозаїки, вірусу поліомієліту, вірусу везикулярного стоматиту). Тонкі відмінності між транскрипцією та реплікацією РНК-вмісних вірусів. Релікація вірусів з амбісенсовим геномом. Зворотня транскрипція, її ферменти та механізми (на прикладі вірусу імунодефіциту людини). Ефект АРОВЕС3G на реплікацію ВІЛ. Стратегії реплікації РНК вмісних вірусів за Балтімором.

Клас III - Віруси з 2-х ланцюговою РНК

1. Первинна транскрипція в цитоплазмі у корі віріону за допомогою вірусної РНК залежної РНК полімерази та експорт +РНК до цитоплазми.
2. Трансляція цієї РНК та накопичення білків
3. Асемблювання +РНК та вірусних білків у незрілі віріони.
4. Транскрипція +РНК у 2-х ланцюгову РНК у віріонах за допомогою вірусної РНК-залежної РНК полімерази.
5. Вторинна транскрипція вірусної 2-х ланцюгової РНК.
6. Кінцева збірка та дозрівання віріонів.

Клас IV- Віруси з 1-но ланцюговою +РНК.

1. Трансляція геномної РНК як матричної РНК (ранні продукти = РНК залежна РНК полімераза)
2. Синтез –РНК на базі +РНК за допомогою вірусної РНК-залежної РНК полімерази (утворення реплікативного комплексу)
3. Синтез геномної +РНК, матричних РНК та –РНК.
4. Трансляція +РНК та матричних РНК, синтез структурних білків (що ймовірно перешкоджає подальшому утворенню +РНК)
5. Збірка структурного білку та +РНК і дозрівання віріонів.

### ТЕМА 3

#### ІНТЕГРАЦІЯ ВІРУСНИХ ГЕНОМІВ

Загальні риси та відмінності в процесах інтеграції геномів вірусів прокариот та еукариот. Ферменти та молекулярні механізми інтеграції геномів бактеріофагів в геном бактеріальних клітин (на прикладі фагів лямбда та Mu). Роль негайно-ранніх білків фага лямбда у виборі життєвого шляху вірусу. Ферменти та молекулярні механізми інтеграції геномів вірусів людини і тварин в геном клітин-хазяїв (на прикладі ретровірусів). Неповна інтеграція. Роль інтеграції геному вірусу в хромосому хазяїна в трансформації клітини. Ек்சцизія та її механізми. Ендогенні ретровіруси та ретроелементи. Склад ретротранспозона. Основні класи ретротранспозонів - Penelope-like retrotransposons, Non-LTR retrotransposons, LTR retrotransposons. Порівняння зворотної транскриптази ретровірусів та ретротранспозонів. Захват гена syncytin у різноманітних плацентарних ссавців. Ретровірусна ендемізація (на прикладі коал). Загальнобіологічне значення інтеграції вірусних геномів в

геноми клітин-хазяїв.

## **ТЕМА 4**

### **ТРАНСКРИПЦІЯ ВІРУСНИХ ГЕНОМІВ**

Транскрипція і трансляція у вірусів прокариотів. Білок-ДНКові взаємодії. Вірусні ДНК-залежні РНК-полімерази. Порівняння транскриптаз у різних бактеріофагів. Ініціація транскрипції у бактеріофагів (на прикладі бактеріофагу Т4). Регуляція транскрипції у помірних вірусів на прикладі фагу лямбда. Роль передранніх генів у розвитку лізогенії. Активація профагу та її молекулярні механізми. Механізми антитермінації транскрипції фага лямбда. Активація транскрипції ранніх та середніх генів бактеріофагу Т4, ключова роль фагового протеїну Alt. Активація транскрипції пізніх генів бактеріофагу Т4. Порівняння транскрипції у фага Т4 та фага Т7. Особливості транскрипції вірусів еукріот. Транскрипція вірусних генів полімеразами I, II та III. РНК-полімерази в життєвому циклі деяких вірусів. Механізми транскрипції у РНК- та ДНК-вмісних вірусів, спільні риси і відмінності. Етапи транскрипції у ДНК-вмісних вірусів – ініціація, елонгація, термінація транскрипції. Варіації в архітектурі базового промотора у вірусів (на прикладі аденовірусів). Експресія раннього регіону у поліомавірусів. Вірусні транскрипційні фактори. Особливості транскрипції генів у РНК-вмісних вірусів. Транскрипція геному вірусу грипу та «викрадання» кепу. Транскрипційні стратегії Рабдо-, Філо-, та Параміксовірусів. Транскрипція коронавірусів та порівняння її механізмів з іншими +РНК-вмісними вірусами. Порівняння транскрипційних стратегій у тобамо- та пікорнавірусів. Транскрипція у вірусів з амбісенсовим геномом. Особливості транскрипції ретровірусів та роль регуляторних білків вірусу (Rev, Tat, Nef) в реалізації генетичної інформації (на прикладі вірусу імунодефіциту людини). Інгібітори транскрипції та її регуляція у вірусів. Енхансери та сайленсори вірусних геномів. Роль вірусспецифічних білків та білків клітини в транскрипції генів вірусів на прикладах різних родин (тобамо-, адено-, герпес-, ретровіруси).

## **ТЕМА 5**

### **ПОСТТРАНСКРИПЦІЙНА МОДИФІКАЦІЯ РНК ВІРУСІВ**

Роль посттранскрипційної модифікації в реалізації генетичної інформації у вірусів. Процесинг і сплайсинг. Відкриття сплайсингу на моделі аденовірусів. Альтернативний сплайсинг ранніх та пізніх транскриптів аденовірусу. Роль альтернативного сплайсингу в реалізації генетичної інформації геному вірусу імунодефіциту людини. Регуляція експорту мРНК ВІЛ білком Rev. Регуляція альтернативного сплайсингу у поліомавірусів (на прикладі вірусу SV40). Ферменти і механізми метилювання, кепування, поліаденілювання вірусних

мРНК. Роль метилювання вірусних геномів в розвитку вірусної інфекції (на прикладі різних груп вірусів). Субгеномні РНК та їх значення. Механізми сплайсингу у вірусів з різними типами організації генетичної інформації. Сплайсеосоми. Роль сплайсингу в збільшенні ємності генетичної інформації вірусів (аденовіруси, ВТМ, SV-40, ВІЛ). Маленькі дволанцюгові РНК (ssRNA) та їх роль в посттранскрипційному мовчанні генів (PTGS). РНК-інтерференція у вірусів (siRNAs, miRNAs). Стадії посттранскрипційного мовчання генів у вірусів. Формування siRNAs та роль Dicer у цьому процесі. Комплекс білків RISC. Розповсюдження сигналу мовчання. Супресія «мовчання» генів вірусами. Інгібування вірусами системного сайленсингу в рослин. РНК-інтерференція як метод антивірусного захисту. Використання механізму РНК-інтерференції для антивірусної терапії. Використання механізму РНК-інтерференції для антивірусної терапії ВІЛ.

## ТЕМА 6

### ТРАНСЛЯЦІЯ ВІРУСНИХ БІЛКІВ

Етапи трансляції та специфічні особливості взаємодії вірусних мРНК з рибосомами у про- та еукаріот. Трансляція у бактеріофагів. Послідовність Шайне-Дельгарно. Конкуренція вірусних та клітинних мРНК на ранніх етапах трансляції. Ініціація, елонгація та термінація трансляції вірусних мРНК у бактеріофагів. Трансляція еукаріотичних вірусів. Моделі ініціації трансляції. Сар-залежна та Сар-незалежна ініціація трансляції вірусних мРНК. Поняття про IRES у вірусів еукаріот. Ініціація трансляції з використанням IRES. Ініціація трансляції з рибосомним шунтом ( на прикладі *Cauliflower mosaic virus* ). Ініціація з рибосомним шунтом у вірусів людини та тварин. Роль вірусспецифічних білків та ферментів в процесах трансляції. Ко- трансляційне звертання, компарменталізація та посттрансляційна модифікація вірусспецифічних білків. Трансмембранний транспорт вірусспецифічних білків. Інгібування вірусами клітинної трансляції на рівні факторів ініціації трансляції. Особливості транскрипції та трансляції mRNA вірусу імунодефіциту людини. Експресійна стратегія Тобамовірусів на прикладі вірусу тютюнової мозаїки.

## ТЕМА 7

### МОЛЕКУЛЯРНІ МЕХАНІЗМИ РАННІХ ЕТАПІВ ВЗАЄМОДІЇ ВІРУСУ З КЛІТИНОЮ

Білки-рецептори вірусів, їх функції та локалізація у віріоні. Корекцептори. Адсорбція у вірусів різних груп організмів (бактерій, рослин, тварин) та її молекулярно-біологічне забезпечення. Роль мембран в проникненні вірусів в клітину. Проникнення в клітину РНК вірусу поліомієліту. Механізми та ферментативне забезпечення фузії та пенетрації віріонів. Адсорбція та проникнення вірусів з суперкапсидною оболонкою (на прикладі вірусу грипу).

Адсорбція та проникнення вірусів з суперкапсидною оболонкою (на прикладі вірусу імунодефіциту людини). Подвійна роль злиття мембран вірусу та клітини-хазяїна. Утворення рецептосоми. Класи вірусних білків злиття. Порівняння організації білків злиття класу I (вірус грипу, ВІЛ) та класу II (альфа- та флавівіруси). Можливості і шляхи міжвидової передачі вірусів (на прикладі коронавірусу).

## **ТЕМА 8**

### **МОЛЕКУЛЯРНІ МЕХАНІЗМИ ПІЗНІХ ЕТАПІВ ВЗАЄМОДІЇ ВІРУСУ З КЛІТИНОЮ**

Відкриття трансдукції. Механізми специфічної та загальної трансдукції. Явище котрансдукції. Абортивна трансдукція. Значення трансдукції для молекулярної біології.

Фолдінг вірусних структурних білків та його забезпечення вірусспецифічними та клітинними білками. Молекулярні механізми самозбірки віріонів на прикладах фагів, вірусів рослин, вірусів людини та тварин. Вихід вірусу з клітини та його забезпечення вірусспецифічними та клітинними білками. Особливості механізмів виходу вірусів з клітини при цитолітичній та нецитолітичній взаємодії. Механізми виходу із клітини складних вірусів.

## **ТЕМА 9**

### **ГЕНЕТИКА НЕКАНОНІЧНИХ ВІРУСІВ**

Загальна характеристика пріонів. К. Гайдучек та С. Прузінер, їх ролі в розумінні біології пріонів. Класичні „вірусні” властивості пріонів. Основні властивості пріонів та їх відмінності від вірусів. Молекулярні механізми розвитку пріонного захворювання. Основні шляхи конформаційного переходу білків пріонів у клітинах тварин. Структура та властивості попередника PrP<sup>c</sup>. Функції PrP<sup>c</sup>. Теорія перетворення PrP<sup>c</sup> на PrP<sup>Sc</sup>. Ген PRNP та його структура. Мутації гену PRNP, що призводять до розвитку спадкових пріонних хвороб. Ген пріонного білку та його експресія. Пріони грибів та їх молекулярно-біологічна характеристика.

## **ТЕМА 10**

### **ХАРАКТЕРИСТИКА ВІРОЇДІВ**

Особливості будови та реплікація РНК віроїдів. Організація геному віроїду. Транспорт віроїдів в інфікованих рослинах. Взаємодія віроїду з компонентами клітини-хазяїна. Механізми реплікації віроїду в ядрі або хлоропласті інфікованої клітини – спільні і відмінні риси. Проникнення віроїдів



крізь ядерну пору. Молекулярний патогенез віроїдів. Порівняння особливостей віроїдів та пріонів як шлях до розуміння їх біології. Деякі гіпотези про походження та природу віроїдів та пріонів.

## **ТЕМА 11**

### **МОЛЕКУЛЯРНО-БІОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ ЕКОЛОГІЇ ТА ЕПІДЕМІОЛОГІЇ ВІРУСІВ**

Гетерогенність вірусних популяцій. Поліморфізм, інтерференція та квазі-генетичні взаємодії популяцій вірусів. Молекулярні основи взаємодії вірусів з переносниками. Молекулярно-біологічні характеристики вірусів як основа розуміння їх інфекційності, географічного поширення, кола господарів, стійкості до факторів зовнішнього середовища.

## ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 1

**Тема. Очистка та концентрація вірусів рослин для молекулярних досліджень.**

**Мета. Отримати очищений концентрований препарат вірусу рослин на прикладі вірусу тютюнової мозаїки.**

**Обладнання.** рН-метр, низькошвидкісна центрифуга, терези, магнітомішалка, холодильник, автоматичні піпетки (20-200 мкл, 200-1000 мкл).

**Матеріали та реактиви, які були використані у роботі**

При виконанні роботи були використані наступні реактиви: поліетиленгліколь 6000, хлороформ, неорганічні компоненти буферних систем вітчизняного виробництва марок “хч” та “чда”.

### Хід роботи

1. Відібрати та зважити вірусомісний рослинний матеріал, покласти його у холодну ступку, додати фосфатний буфер (рН=7,4) у співвідношенні 1:2 та гомогенізувати рослинний матеріал;

2. Відфільтрувати через марлю гомогенізмат, перелити його у пробірку та додати хлороформ у співвідношенні 7:1, пробірку струшувати протягом 20 хв, дати фазам розділитися, відібрати верхню фазу та перенести її до центрифужної пробірки;

3. Центрифужні пробірки урівноважити та центрифугувати вірусомісний матеріал у режимі 5000 об/хв протягом 20 хв, після цього відібрати надосад.

4. Концентрацію препарату провести за допомогою інкубації надосадової рідини на магнітній мішалці з додаванням 5 % поліетиленгліколю 6000 та 1,2 % NaCl протягом ночі при 4°C.

5. Після інкубації відцентрифугувати в режимі 12 тис об/хв – 20 хв (або 5,5 тис. об/хв протягом 50 хв ).

6. У подальшому осад ресуспендували в 0,05М PBS, рН-7,4, з наступним високошвидкісним центрифугуванням у режимі 24 тис.об/хв протягом 120 хв.\*

7. Утворений осад ресуспендували в 0,01М PBS, рН-7,4 та центрифугували у режимі 5 тис.об/хв протягом 15 хв.

8. Вірусомісний матеріал зберігати при температурі -20С.

\*Примітка: Якщо необхідно отримати високо очищений вірусний препарат ВТМ, доцільно додатково провести високошвидкісне центрифугування через 20%-ну сахарозну подушку в режимі 27 тис.об/хв протягом 110 хв

### *Завдання для самостійної роботи*

1. Скласти схему виділення ліпідвмісних вірусів.
2. Скласти схему виділення вірусів з різною ізоелектричною точкою.

3. Порівняти методи виділення вірусів для електронної мікроскопії та для пасування на рослинах.
4. Порівняти схеми виділення вірусів рослин для отримання антивірусної сироватки та для накопичення вірусу.
5. Зазначити методи які використовуються тільки для очистки вірусних препаратів, а які можна використовувати як для очищення, так і концентрації фітовірусів.

## ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 2

**Тема.** Вивчення поліпептидного складу білків вірусів рослин та бактерій методом електрофорезу за Леммлі.

**Мета.** Провести електрофоретичне розділення структурних білків різних вірусів рослин та визначити їх молекулярні маси.

**Обладнання.** Комерційний апарат для вертикального електрофорезу (“Хію Каллур”, Латвія), блок живлення ПЕФА-1, рН-метр, сканер та комп’ютер із програмним забезпеченням, водяна баня, автоматичні піпетки (20-200 мкл, 200-1000 мкл).

**Матеріали та реактиви, які були використані у роботі**

При виконанні роботи були використані наступні реактиви:

кумассі блакитний R– 250, додецилсульфат натрію, набір маркерних білків LMW (“Pharmacia”, Швеція); тріс, гліцин, акриламід, біс-акриламід (“BDH”, Англія); неорганічні компоненти буферних систем вітчизняного виробництва марок “хч” та “чда”.

**Розчини для електрофорезу:**

1. Концентрований розчин поліакриламід (ПАА)
 

акриламід	29,2г
бісакриламід	0,8г
H <sub>2</sub> O	до 100мл
2. 1,4М тріс-НСІ буфер, рН 8,8;
 

тріс	17г
H <sub>2</sub> O	до 100мл
НСІ	до рН 8,8
3. 0,5М тріс-НСІ буфер, , рН 6,8:
 

тріс	3,02г
H <sub>2</sub> O	до 50мл
НСІ	до рН 6,8
4. 10% водний розчин додецилсульфату натрія: 1г на 10мл.
5. 10% водний розчин персульфату амонія: 50мг на 500мкл.
6. електродний буфер, рН 8,3:
 

тріс	2,7г
гліцин	12,96г
додецилсульфат натрію	0,9г

- |                  |        |  |  |
|------------------|--------|--|--|
| H <sub>2</sub> O | 900 мл |  |  |
|------------------|--------|--|--|
7. буфер зразку:
- |                             |  |         |  |
|-----------------------------|--|---------|--|
| дист. H <sub>2</sub> O      |  |         |  |
| 0,5М тріс-НСІ буфер, рН 6.8 |  | 0,2мл   |  |
| гліцерин                    |  | 0,4мл   |  |
| 10% додецилсульфат натрію   |  | 0,4мл   |  |
| 2в-меркаптоетанол           |  | 0,028мл |  |
| 1% бромфеноловий голубий    |  | 0,01мл  |  |
8. Розділяючий гель 14%:
- |  |       |         |        |
|--|-------|---------|--------|
| H <sub>2</sub> O                         | 6мл   | 4мл     |        |
| 1,4М тріс-НСІ буфер, рН 8,8              | 5мл   | 3,4мл   |        |
| 10% водний розчин додецилсульфату натрію |       | 0,2мл   | 0,14мл |
| 10% водний розчин персульфату амонія     |       | 0,067мл | 0,1мл  |
| концентрований розчин поліакриламід      |       | 9,4мл   | 6,3мл  |
| TEMED                                    | 10мкл | 15мкл   |        |
9. Стартовий гель 5%
- |  |        |        |  |
|--|--------|--------|--|
| H <sub>2</sub> O                         | 2,8мл  |        |  |
| 0,5М тріс-НСІ буфер, рН 6,8              | 1,25мл |        |  |
| 10% водний розчин додецилсульфату натрію |        | 0,05мл |  |
| 10% водний розчин персульфату амонія     |        | 0,05мл |  |
| концентрований розчин поліакриламід      |        | 0,85мл |  |
| TEMED                                    | 7мкл   |        |  |
10. Набір маркерних білків LMW (“Pharmacia”, Швеція):
- фосфорилаза – 94.0 кДа;
  - альбумін – 67.0 кДа;
  - овальбумін – 43.0 кДа;
  - карбонатангідраза – 30.0 кДа;
  - інгібітор трипсину – 20.1 кДа;
  - лактальбумін – 14.4 кДа.
11. Розчин для фарбування гелю
- |                         |       |
|-------------------------|-------|
| кумассі блакитний R-250 | 100мг |
| метанол                 | 50мл  |
| оцтова кислота          | 10мл  |
| H <sub>2</sub> O        | 40мл  |
12. Розчин відмивки після фарбування гелю
- |                              |       |
|------------------------------|-------|
| концентрована оцтова кислота | 70мл  |
| H <sub>2</sub> O             | 930мл |

### Хід роботи

1. Підготувати камеру для електрофорезу шляхом знежирення її ефіром та 96% етиловим спиртом. Зібрати камеру.
2. Приготувати та залити розділяючий гель на 2см нижче верхнього краю скляної пластинки. Нашарувати ізобутанол насичений водою для

- рівномірної полімеризації поверхні. Після полімеризації видалити ізобутанол та промити гель дистильованою водою.
3. Приготувати та залити стартовий гель і вставити гребінку для утворення лунок. Після полімеризації видалити гребінку.
  4. Підготувати зразки для електрофорезу. У конічні пробірки внести досліджуваний матеріал та маркерні білки по 30 мкл, додати до кожної пробірки по 10 мкл буферу зразку та інкубувати їх при 100°C на водяній бані протягом 3 хв. Для визначення молекулярної маси невідомих білків використати набір маркерів
  5. Вставити камеру у прилад для електрофорезу, залити електродний буфер, щоб він на 2 мм покривав залитий стартовий гель.
  6. У лунки стартового гелю нанести за допомогою автоматичної піпетки по 40 мкл маркерні білки та відповідні зразки.
  7. Підключити прилад до джерела струму, увімкнути його та встановити режим 40 мА.
  8. Вимкнути струм, коли барвник досягне нижнього краю скляних пластинок електрофорезної камери. Злити електродний буфер та обережно зняти гель із скляних пластинок.
  9. Занурити гель у 100 мл розчину для фарбування на 1-2 год.
  10. Злити розчин для фарбування та залити гель 100 мл розчину відмивки та інкубувати при 37°C протягом 1 год. Відмивку повторити 5-6 разів до повної прозорості гелю.
  11. Сканування гелю та розрахунок молекулярної маси білків та їх концентрації з використанням комп'ютерної програми.
  12. Друк результатів електрофорезу.

### ***Завдання для самостійної роботи***

1. Описати різні типи електрофорезу білку.
2. Вказати області застосування різних типів електрофорезу. Література [15,16]

## **ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 3**

**Тема.** Дослідження антигенних властивостей структурних білків вірусів рослин методом імуелектроноблотингу

**Мета.** Визначити молекулярну масу антигенних детермінант структурних вірусних білків.

**Обладнання.** Комерційний апарат для вертикального електрофорезу ("Хію Каллур", Латвія), блок живлення ПЕФА-1, рН-метр, сканер та комп'ютер із програмним забезпеченням, водяна баня, автоматичні піпетки (20-200 мкл, 200-1000 мкл), терези.

**Матеріали та реактиви, які були використані у роботі**

При виконанні роботи були використані наступні реактиви: кумассі блакитний R- 250, додецилсульфат натрію, набір маркерних білків LMW (“Pharmacia”, Швеція); тріс, гліцин, акриламід, біс-акриламід (“BDH”, Англія); сухе молоко, трітон X100, метанол, неорганічні компоненти буферних систем вітчизняного виробництва марок “хч” та “чда”.

### **Хід роботи**

Імуноелектроблотин проводять в три етапи:

1. Провести електрофоретичне розділення структурних вірусних білків методом електрофорезу за Леммлі.
2. Провести електроблотинг за Товбіним на нітроцелюлозні мембрани.

Біополімери, які були розділені за допомогою електрофорезу, перенести із гелю на нітроцелюлозну мембрану (НЦМ) (“Schleicherand Schuell”, Німеччина) протягом 16 годин при 4<sup>0</sup>С. Перенесення здійснюють у буфері Towbin

тріс-НСІ – 0.3%;

гліцин – 1.45%;

метанол – 20%.

Перед проведенням блотингу для ренатурації гель інкубують у буфері перенесення з додаванням 1% тритону X-100 (“Serva“, Німеччина). Ефективність переносу біополімерів з ПААГ контролюють фарбуванням гелю кумассі блакитним R-250; ефективність адсорбції на НЦМ – при зворотньому фарбуванні матриці понсо (“BDH”, Англія).

3. Детекція вірусних антигенів на нітроцелюлозній мембрані методом ІФА з використання поліклональних антитіл мічених пероксидазою хрому або лужною фосфатазою.

Вільні місця на НЦМ блокують 2% розчином БСА у 0.1 М фосфатному буфері, рН 7.4, протягом 2 годин. Інкубацію з кролячими імунними сироватками здійснюють протягом 16–18 год при 4<sup>0</sup>С. Робоче розведення сироваток (1:1000) готують на фосфатному буфері з додаванням 0.05% Tween-20 та 1% БСА. Після відмивання НЦМ інкубують протягом 2 год при 37<sup>0</sup>С з міченими пероксидазою хрому або лужною фосфатазою баранячими антитілами проти імуноглобулінів кроля (“Bio-Rad”, США). Для візуалізації реакції з пероксидазою хрому використовують субстрат (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) і хромоген (4-хлор-1-нафтол) (“Merck”, Німеччина). Реакцію зупиняли дистильованою водою.

### **Завдання для самостійної роботи**

1. Порівняти ефективність різних типів блотингу білків та методів їх детекції на носіях.
2. Методи візуалізації результатів блотингу білків.

### 3. Блотинг нуклеїнових кислот.

## ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 4

**Тема. Методи виділення вірусних нуклеїнових кислот вірусів.**

**Мета. Опанувати та порівняти ефективність різних методів очистки нуклеїнових кислот вірусів.**

**Обладнання.** Комерційний апарат для горизонтального електрофорезу, блок живлення ПЕФА-1, настільна центрифуга для пробірок типу «Епендорф», рН-метр, водяна баня, автоматичні піпетки (20-200 мкл, 200-1000 мкл), терези, транслюмінатор.

**Матеріали та реактиви, які були використані у роботі**

При виконанні роботи були використані наступні реактиви: додецилсульфат натрію, тріс, етанол, фенол, хлороформ, ізоаміловий спирт, етидій бромід сахароза, агароза, неорганічні компоненти буферних систем вітчизняного виробництва марок “хч” та “чда”.

### Хід роботи

**1. Фенол-хлороформний метод виділення нуклеїнових кислот вірусів.**

1. Вірус в буфері тріс-НСІ, рН 7.6, або в калій-фосфатному буфері, рН 7.4 (вірусний матеріал не повинен знаходитись в ФБР, тому що Na з додецилсульфатом натрію дає нерозчинний осад), змішують з додецилсульфатом натрію до 2% по об'єму, прогривають при 70<sup>0</sup>С до зникнення опалесценції.
2. Додають рівний об'єм насиченого фенолу, м'якко перемішують при кімнатній температурі 10 хв.
3. Центрифугують препарат протягом 10 хв при 5 тис об./хв.
4. Відбирають водну фазу та додають рівний об'єм фенолу, інкубують протягом 10 хв.
5. Центрифугують протягом 10 хв. при 5 тис об/хв., збирають водну фазу.
6. До водної фази додають рівний об'єм фенол : хлороформ у співвідношенні 1:1, перемішують протягом 10 хв.
7. Центрифугують протягом 10 хв при 5 тис об/хв, відбирають водну фазу та додають рівний об'єм хлороформу, перемішують протягом 10 хв.
8. Центрифугують протягом 10 хв при 5 тис об/хв.
9. Відбирають водну фазу та додають 1/10 від загального об'єму 3 М ацетат натрію, рН 5.2, та 3 об'єми 96 % С<sub>2</sub>Н<sub>5</sub>ОН, інкубують при -20<sup>0</sup>С протягом ночі.
10. Центрифугують протягом 15 хв при 15 тис об/хв.
11. Осад промивають 70% етанолом.

**2. Виділення НК з використанням додецил-сульфату натрія**

1. Додати 10% SDS до 1% - 2 год при 60С
2. Додати 5 М NaCl до 0,9 М NaCl

3. Низькошвидкісне центрифугування 7000 об/хв
4. Відібрати надосад, та додати 0,7 частини холодного ізопропанола на ніч в морозилку.
5. НШЦ 7000 об/хв протягом 20хв
6. До осаду додати 20-40 мкл дист. H<sub>2</sub>O

### **3. Виділення НК “гарячим методом”.**

1. Додати до вірусного матеріалу 1 мл додати 25 мкл 0,5М ЕДТА + 10 мкл 10% SDS.i на водяну баню на 30хв, потім в морозильну камеру на 30 хв
2. НШЦ в режимі 5000об/хв протягом 10 хв.
3. Відбираємо надосад додаємо охолоджений спирт 2 об’єма, поміщаємо в морозилку на 30 хв
4. НШЦ 30 хв 6 000 об/хв
5. Осад ресуспендуємо в ТВЕ.

### **4. Виділення нуклеїнової кислоти за допомогою СТАВ методу**

1. Вірусний препарат вносять в мікропробірки, заливають 1,5 мл СТАВ-буферу, ретельно перемішують та ставлять в термостат при 65°C 1 год. Кожні 10 хв обережно помішують;
2. Після інкубації центрифугують 5 хв при 13000 об/хв;
3. До зразку додають хлороформ у співвідношені 1:1;
4. Зразок , ретельно перемішують протягом 10 хв;
5. Центрифугують 10 хв при 13000 об/хв;
6. Супернатант осаджують ізопропіловим спиртом 1:1,5 (зразок:спирт), поміщують на 10-15 хв в холодильник;
7. Центрифугують 5 хв при 13000 об/хв;
8. Осад промивають 100 мкл 70% етанолом;
9. Центрифугують 2 хв при 13000 об/хв;
10. Надосад зливають, а осад в якому власне міститься ДНК висушують, після чого розчиняють в мінімальній кількості ТЕ-буферу.

### **5. Проведення горизонтального електрофорезу в агарозному гелі.**

Після виділення якість препарату нуклеїнової кислоти оцінюють горизонтальним електрофорезом препаратів в 0.8 % агарозному гелі в 0.089 М тріс-боратному буфері, рН 8.0.

1. Готується 0,8 % розділяючий агарозний гель (з розрахунку 160 мкг агарози на 20 мл ТВЕ; розчин гріють до повного розчинення осаду; до розчину додають розчин 1 мг/мл бромистого етидію до кінцевої концентрації 0.5 мкг/мл.
2. Агарозний гель заливають в форму та ставлять гребінку (для утворення лунок), очікують, поки він застигне.
3. Готують 6 кратний буфер зразка (40% сахарозу з додаванням 2 мкг барвника).
4. Підготовка зразків. Зразки розводять в кінчних пробірках чи плашках (15 мкл препарату та 3 мкл буфера зразка).



5. Вставляють гель у прилад для електрофорезу, заливають ТВЕ , щоб він на 2 мм покривава гель.
6. У лунки гелю за допомогою автоматичної піпетки наносять по 15 мкл маркерів та відповідні зразки.(за рахунок 40% розчину сахарозу зразок рівномірно опускається на дно лунки)
7. Підключають прилад до джерела струму, вмикають його та встановлюють режим у залежності від розміру гелю та камери 40 мА-90мА.
8. Вимикають струм, коли барвник досягне краю гелю. Зливають буфер та обережно знімають гель.
9. Гель проглядають під УФ випроміненням (оскільки при видимій довжині світла нуклеїнову кислоту не можна помітити; але в поєднанні з етидій бромідом під дією УФ випромінюється хвилі видимого спектра).

**6. Встановлення концентрації ДНК спектрофотометричним методом.**

**7. Характеристика нативності ДНК фага Т4 з використанням NaOH.**

### *Завдання для самостійної роботи*

1. Описати відмінності у виділенні ДНК та РНК вірусів.
2. Методи визначення типу нуклеїнової кислоти у вірусів.
3. Аналіз електрофореграм нуклеїнових кислот

## **ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 5**

**Тема. Молекулярні методи детекції вірусів.**

**Мета. Опанувати ЗТ-ПЛР для детекцію вірусів рослин різних таксономічних груп.**

**Обладнання.** Ампліфікатор, настільна центрифуга для пробірок типу «Епандорф», водяна баня, автоматичні піпетки (20-200 мкл, 200-1000 мкл), терези, транслюмінатор.

**Матеріали та реактиви, які були використані у роботі**

При виконанні роботи були використані специфічні праймери до гену капсидного білку вірусу тютюнової мозаїки, вірусу огіркової мозаїки, вірусу мозаїки кавуна, QIAGEN One-step RT-PCR Kit, Thermo Scientific RevertAid Reverse Transcriptase, DreamTaq Green DNA Polymerase.

### **Хід роботи**

1. Провести ЗТ-ПЛР із зразками тотальної РНК виділеної з інфікованих рослин і за величиною продукту ампліфікації ідентифікувати вірус. Постановка двокрокової ЗТ-ПЛР з використанням Thermo Scientific RevertAid Reverse Transcriptase згідно з рекомендаціями виробника.

А) На першому етапі синтезувати кДНК шляхом зворотнотранскрипційної реакції. Для цього внести у стерильну, вільну від нуклеаз пробірку:

- тотальну РНК (3 мкл);
- праймери, специфічні до гену капсидного білку (1 мкл);
- воду, оброблену DEPC (8,5 мкл).

Після цього обережно перемішали, осадили краплі за допомогою центрифугування, інкубували суміш при 65°C протягом 5 хвилин, охолодили на льоду.

Додати наступні компоненти у даному порядку:

- 5X Reaction Buffer (4 мкл);
- Суміш dNTP (2 мкл);
- RevertAid Reverse Transcriptase (1 мкл).

Обережно перемішали та осадили краплі. Інкубували при 42 °C протягом 60 хвилин для здійснення зворотнотранскрипційної реакції. Закінчення реакції спричинювали нагріванням до 72°C за 10 хвилин.

Б) Наступним етапом провести ПЛР з отриманою кДНК.

До складу суміші для ПЛР входять наступні компоненти:

- Отримана кДНК (3 мкл);
- Прямий праймер (1мкл);
- Зворотній праймер (1 мкл);
- Стерильна вода (7,5 мкл);
- DreamTaq Green DNA Polymerase (12,5 мкл).

Умови для ампліфікації:

- 95°C 1 хвилина (1 цикл);
- денатурація при 95°C 30 секунд (30 циклів);
- відпал праймерів при 56°C 30 секунд (30 циклів);
- елонгація при 72°C 1 хвилина (30 циклів);
- 72°C 5 хвилин (1 цикл).

У залежності від праймерів змінювати температуру відпалу праймерів.

Для вірусу огіркової мозаїки - температура відпалу праймерів становить 56°C, величина продукту 500пн;

Для вірусу тютюнової мозаїки - температура відпалу праймерів становить 62°C, величина продукту 700пн;

Для вірусу мозаїки кавуна - температура відпалу праймерів становить 63°C, величина продукту 825 пн.

Величину продукту ампліфікації визначити за допомогою електрофорезу у 1,5% агарозному гелі. з використанням стандартного набору маркерів Gene Ruller 100 bp RNA Ladder plus (Fermentas, США).

2. Ознайомитись з однокроковою модифікацією постановка ЗТ-ПЛР. з використанням набору QIAGEN One-step RT-PCR Kit (Qiagen, Велика Британія).

Створити інкубаційну суміш до складу якої входять наступні компоненти:

- 5x Qiagen OneStep RT-PCR – 10мкл;

- суміш dNTP (містить 10 мМ кожного dNTP) – 2 мкл;
- 5x Q-розчину – 10 мкл;
- прямий праймер – 2 мкл;
- зворотний праймер – 2 мкл;
- суміш фермента Qiagen OneStep RT-PCR – 2 мкл;
- матриця РНК – 6 мкл;
- вода, вільна від РНК-аз – 16 мкл.

Умови постановки однокрокової ЗТ-ПЛР:

- 50°C – 30 хв (зворотна транскрипція; 1 цикл);
- 95°C – 15 хв (початкова стадія ПЛР, активація HotStarTaq ДНК полімерази; 1 цикл);
- 94°C – 30 с (денатурація, 30 циклів);
- 56°C – 30 с (відпал праймерів, 30 циклів);
- 72°C – 1 хв (елонгація ланцюга, 30 циклів);
- 72°C – 10 хв (фінальна елонгація, 1 цикл).

Величину продукту ампліфікації визначити за допомогою електрофорезу у 1,5% агарозному гелі. з використанням стандартного набору маркерів Gene Ruller 100 bp RNA Ladder plus (Fermentas, США).

### ***Завдання для самостійної роботи***

1. Охарактеризувати молекулярні методи детекції вірусів рослин та бактеріофагів.
2. Вказати діагностичні маркери для детекції вірусів рослин та бактеріофагів.
3. Вказати принцип підбору праймерів.
4. Основні вимоги до режиму полімеразної ланцюгової реакції.

## **ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 6**

**Тема. Рестрикційний аналіз нуклеїнових кислот вірусів рослин та бактеріофагів.**

**Мета. Ознайомитись з побудовою рестрикційних карт вірусів рослин та бактеріофагів.**

### **Хід роботи.**

5. Вибрати із Генбанку 10 нуклеотидних послідовностей РНК полімераз різних вірусів рослин і провести їх рестрикційний аналіз з використанням рестриктаз BamH1, EcoR1, Hpa II та Tag I.
6. Порівняти отримані рестрикційні фрагменти між собою
7. Побудувати рестрикційну карту гену капсидного білку вірусу тютюнової мозаїки та бактеріофагу Т4 з використанням рестриктаз BamH1, EcoR1, Hpa II та Tag I.

### ***Завдання для самостійної роботи***

1. Навести приклади використання рестрикційного аналізу геному вірусу
2. Побудова рестрикційної карти фагу Т4.

### *Контрольні запитання до матеріалу спецкурсу*

1. Проникнення та початок функціонування вірусного геному в клітині.
2. Загальна схема реплікації вірусних геномів.
3. Відмінності в схемах реплікації одно- та дволанцюгових ДНК- геномів.
4. Клітинні та вірусіндуковані ферменти реплікації ДНК вірусів.
5. Реплікативні форми вірусних НК.
6. Механізм і ферменти реплікації вірусних РНК.
7. Етапи транскрипції вірусних геномів – ініціація, елонгація, термінація транскрипції.
8. Регуляція транскрипції провірусних геномів
9. Механізми антитермінації фага лябда.
10. Процесінг продуктів транскрипції вірусних генів.
11. Сплайсинг вірусних генів
12. Альтернативний сплайсинг вірусних генів
13. Транскрипція та трансляція HIV mRNA
14. Альтернативний сплайсинг мРНК ВІЛ
15. Регуляція експорту мРНК ВІЛ білком Rev
16. Роль АРОВЕС3G в реплікації ВІЛ
17. Ферменти та регуляція транскрипції у ДНК-вмісних вірусів.
18. Транскрипція у РНК-вмісних вірусів та її відмінності від реплікації.
19. Експресійна стратегія Тобамовірусів
20. Транскрипція вірусу грипу
21. Механізми кепування та поліаденування субгеномних мРНК у вірусів еукаріот.
22. Зворотня транскрипція, її ферменти та механізми.
23. Реалізація генетичної інформації в процесі синтезу віруссpezifічних білків та самозбірці віріонів
24. Ініціація трансляції мРНК вірусів з використанням IRES
25. Ініціація трансляції мРНК вірусів з рибосомним шунтом
26. Вплив вірусів на механізми трансляції клітини-хазяїна
27. РНК-інтерференція у вірусів
28. Роль Dicer та RISC у формуванні РНК-інтерференції у вірусів
29. Супресія «мовчання» генів вірусами
30. Використання механізму РНК-інтерференції для антивірусної терапії
31. Використання «мовчання РНК» для отримання трансгенних рослин, стійких до патогенів вірусної етіології
32. Описати принцип диск-електрофорезу, вказати його недоліки та переваги.
33. Охарактеризуйте відомі вам методи виділення нуклеїнових кислот.
34. Наведіть етапи імуноелектроблотингу та вкажіть типи іммобілізуючих мембран.

35. Вказати реагенти та роль кожного з них при полімеризації поліакриламідного гелю.
36. Охарактеризуйте фенол-хлороформний метод виділення НК.
37. Вказати типи блотингу та їх ефективність. Наведіть приклади застосування імуноелектроблотингу.
38. Охарактеризуйте відомі вам модифікації електрофорезу білків.
39. Опишіть метод електрофорезу нуклеїнових кислот та вкажіть приклади його застосування.
40. Наведіть етапи імуноелектроблотингу та вкажіть типи іммобілізуючих мембран.
41. Порівняйте між собою електрофореуз білків та нуклеїнових кислот.
42. Вказати типи блотингу та їх ефективність. Навести приклади застосування імуноелектроблотингу.
43. За якими показниками, на вашу думку, можна визначити концентрацію, чистоту та гомогенність препарату НК?
44. Поясніть, як з допомогою електрофорезу можна визначити масу невідомих білків.
45. Опишіть принцип методу імуноелектрофорезу.
46. Вкажіть недоліки та переваги відомих вам методів виділення НК

## Приклади тестових питань

### 1. Назвати сполуки, з яких складаються прості віруси:

- а) тільки з нуклеїнової кислоти; б) тільки з білку;
- в) тільки з ліпідів і вуглеводів; г) з нуклеїнової кислоти і білку;
- д) з нуклеїнової кислоти, білку, ліпідів і вуглеводів;
- е) з нуклеїнової кислоти, ліпідів і вуглеводів.

### 2. Назвати сполуки, з яких складаються складні віруси:

- а) тільки з нуклеїнової кислоти; б) тільки з білку;
- в) тільки з ліпідів і вуглеводів; г) з нуклеїнової кислоти і білку;
- д) з нуклеїнової кислоти, білку, ліпідів і вуглеводів;
- е) з нуклеїнової кислоти, ліпідів і вуглеводів.

### 3. Яких вірусних ДНК не існує:

- а) лінійна одноланцюгова; б) кільцева одноланцюгова;
- в) лінійна дволанцюгова; г) лінійна дволанцюгова із замкненими кінцями;
- д) замкнений кільцевий подвійний ланцюг;
- е) лінійна одноланцюгова із замкненими кінцями.

### 4. Яких вірусних РНК не існує:

- а) лінійний одноланцюговий інфекційний плюс-ланцюг;
- б) лінійний одноланцюговий неінфекційний мінус-ланцюг;
- в) «диплоїдна» одноланцюгова; г) сегментовані мінус-ланцюги;
- д) дволанцюгова сегментована; е) лінійна дволанцюгова із замкненими кінцями.

### 5. Зазначити стратегію реалізації генетичної інформації вірусу грипу:

- а) длДНК→мРНК→білок; б) длРНК→ мРНК→білок;
- в) +РНК→ мРНК→білок; г) -РНК→ мРНК→білок;
- д) олРНК→длДНК→мРНК→білок; е) олДНК→длДНК→мРНК→білок.

### 6. Зазначити стратегію реалізації генетичної інформації аденоасоційованого парвовірусу:

- а) длДНК→мРНК→білок; б) длРНК→ мРНК→білок;
- в) +РНК→ мРНК→білок; г) -РНК→ мРНК→білок;
- д) олРНК→длДНК→мРНК→білок; е) олДНК→длДНК→мРНК→білок.

### 7. Зазначити стратегію реалізації генетичної інформації вірусу саркоми Рауса:

- а) длДНК→мРНК→білок; б) длРНК→ мРНК→білок;  
в) +РНК→ мРНК→білок; г) -РНК→ мРНК→білок;  
д) олРНК→длДНК→мРНК→білок; е) олДНК→длДНК→мРНК→білок.

**8. Стратегія реплікації геному вірусу грипу:**

- а) длДНК→ длДНК б) длРНК→ олРНК→ длРНК  
в) -РНК→+РНК→-РНК г) +РНК→-РНК→+РНК  
д) олРНК→ длДНК→ олРНК е) длДНК→ олРНК→ длДНК

**9. Зазначити стратегію реплікації геному вірусу гепатиту В:**

- а) длДНК→ длДНК; б) длРНК→ олРНК→ длРНК;  
в) -РНК→+РНК→-РНК; г) +РНК→ -РНК→+РНК;  
д) олРНК→длДНК→олРНК; е) длДНК→олРНК→ длДНК.

**10. Визначити родини вірусів, у представників яких зустрічаються амбісенсові геноми:**

- а) *Filoviridae*; б) *Flaviviridae*; в) *Coronaviridae*;  
г) *Hepadnaviridae*; д) *Retroviridae*; е) *Bunyaviridae*.

**11. Вказати сполуки, які забезпечують профаговий стан бактеріофагу л:**

- а) малі інтерферуючі РНК; б) білок-репресор фагу;  
в) клітинні білки-репресори; г) фермент інтеграза;  
д) фермент РНК-полімераза; е) фермент метилтрансфераза.

**12. Зазначити, чим забезпечується збільшення інформаційної ємності вірусних геномів:**

- а) неоднозначність генетичного коду вірусів; б) виродженість генетичного коду;  
в) зсув рамки зчитування; г) суперспіралізація нуклеїнової кислоти;  
д) дволанцюговість РНК; е) інтеграція у геном клітини.

**13. Перелічити основні етапи виділення нуклеїнової кислоти**

**14. Фенол при виділенні НК необхідний для .....**

**15. Додецилсульфат натрію надає негативного заряду... , що необхідно для...**

**16. Ізоаміловий спирт при виділенні НК додають до:**

- а) фенолу
- б) хлороформу

**17. Осаджують нуклеїнову кислоту:**

- А) розчином SDS
- Б) етиловим спиртом
- В) ізопропанолом

**18. Чистоту нуклеїнової кислоти визначають:**

- а) за електрофорезом
- б) спектрофотометрично
- в) імуноферментно

**19. Нуклеїнова кислота в електричному полі рухається до:**

- а) анода
- б) катода

**20. Барвником для ДНК слугує:**

- А) бромфеноловий голубий
- Б) бромистий етидій

**21. Електрофорез НК проводять:**

- А) в агарозному гелі
- Б) в поліакриламідному
- В) в крохмальному

**22. Сахароза в буфері зразку при виділенні НК використовується для:**

**23. Білок репресор зв'язується з ДНК за допомогою:**

- а) карбокси-кінцевих доменів



б) амінокінцевих домені

**24 Білок Cro здійснює:**

- а) позитивну регурацію власної транскрипції
- б) негативну регуляцію власної транскрипції
- в) негативну регуляцію транскрипції cI

**25. Білок RecA під впливом УФ руйнує:**

- а) білок Cro
- б) білок репресор
- в) РНК-полімеразу

**26. Для літичного та лізогенного стану фагу  $\lambda$  спільним є:**

- а) транскрипція генів N та cro в передранній стадії
- б) траскрипція гену cI
- в) транскрипція гену cII

**27. На пізній стадії літичної інфекції:**

- а) накопичується достатня к-сть продукту гену Q
- б) накопичується достатня к-сть продукту гену cII
- в) накопичується достатиня к-сть продукту гену cI

**28. Білок cII відповідає:**

- а) за прийняття рішення щодо літчного чи лізогенного шляху фагу  $\lambda$
- б) за інтеграцію геному фагу  $\lambda$  в бактеріальний
- в) за стійкість фагу  $\lambda$  до умов оточуючого середовища

**29. Неструктурний білок Enterobacteria phage M13**

- а) gp6
- б) gp8
- в) gp2

**30. Кооперативне зв'язування необхідне для транскрипції:**

- а) гену білку-репресору
- б) гену білку Cro

**31. Білок репресор здійснює одночасно:**

- а) позитивну регурацію власної транскрипції
- б) негативну регуляцію власної транскрипції
- в) негативну регуляцію транскрипції cro

**32. Перемикання регуляторного апарату фагу  $\lambda$  відбувається за рахунок:**

- а) при дії УФ на бактеріальну клітину
- б) при низькій активності гену cII
- в) при низькій активності гену cIII

**33. Білок антитермінатор, що призводить до підвищеної транскрипції з P<sub>r</sub>**

- а) продукт гену N
- б) продукт гену Q

**34. Реплікативна транспозиція властива для:**

- а) фагу P22
- б) фагу Mu
- в) фагу  $\lambda$

**35. Геном фагів Mollicutes представлений:**

- а) тільки 2-х ланцюговою ДНК
- б) тільки 1-но ланцюговою ДНК або РНК
- в) тільки ДНК

**36. Геном Actinomycetes phage SK1 представлений:**

- а) 2-х ланцюговою РНК
- б) 2-х ланцюговою лінійною ДНК
- в) 1-но ланцюговою ДНК

**37. Загальну трансдукцію здійснює:**

- а) фаг  $\lambda$
- б) фаг P22
- в) фаг ф80

**38. Отримання трансдукуючого фрагменту при загальній трансдукції відбувається:**

- а) за рахунок гомологічної рекомбінації
- б) за рахунок інтеграції фагу в геном бактерії

**39. Фаг  $\lambda$  здійснює:**

- а) неспецифічну трансдукцію гену gal
- б) специфічну трансдукцію гену bio
- в) специфічну трансдукцію гену trp

**40. Нарізання конкатемерів фагу  $\lambda$  відбувається по:**

- а) рас сайтах
- б) cos сайтах

**41. Специфічну трансдукцію здійснює:**

- а) фаг  $\lambda$
- б) фаг ф80
- в) фаг P1

**42. Отримання трансдукуючого фрагменту при специфічній трансдукції відбувається:**

- а) за рахунок гомологічної рекомбінації
- б) за рахунок інтеграції фагу в геном бактерії

**43. Фаг ф80 здійснює:**

- а) неспецифічну трансдукцію гену *bio*
- б) специфічну трансдукцію гену *gal*
- в) специфічну трансдукцію гену *trp*

**44. Трансдукція, при якій може переноситись будь-який фрагмент ДНК господаря:**

- а) специфічна
- б) загальна
- в) абортивна

**45. Частота котрансдукції більша у:**

- а) близько розміщених генів на бактеріальній хромосомі;
- б) віддалено розміщених генів на бактеріальній хромосомі

**46. Фермент зворотня транскриптаза необхідний для розвитку**

- А) Вірусу грипу
- Б) Вірусу імунодефіциту
- В) Вірусу гепатиту дельта

**47. Різниця між PrP<sup>Sc</sup> та PrP<sup>C</sup> полягає:**

- А) у резистентності до дії протеаз;
- Б) специфічності до антитіл
- В) здатністю накопичуватися у

**48. Конверсія нормального пріонного білку в його інфекційну форму:**

- А) пострасляційний процес;
- Б) посттранскрипційний процес;
- В) інфекційна форма пріонного білку утворюється в процесі метилювання;

**49. Віроїди інфікують**

- А) бактерії
- Б) людину
- В) рослини
- Г) водорості

**50. Геном віроїдів представлений**

- А) одноланцюговою ДНК
- Б) одноланцюговою РНК
- В) дволанцюговою РНК

**51. Для детекції аденовірусів потрібно використовувати**

- А) ПЛР
- Б) ЗТ-ПЛР
- В) ІФА

**52. Для детекції віроїдів використовують**

- А) ПЛР
- Б) ЗТ-ПЛР
- В) ІФА

**53. Праймери для ПЛР це**

- А) виділені від вірусу ділянки ДНК
- Б) штучно синтезовані олігонуклеотиди
- В) 2-во ланцюгові ділянки ДНК

**54. Для детекції представників однієї родини потрібно відібрати у послідовності геному:**

- А) консервативну ділянку
- Б) варіативну ділянку
- В) амбісенсову ділянку

**55. РНК-залежна-ДНК-полімераза необхідна для:**

- А) гніздової-ПЛР
- Б) ЗТ-ПЛР
- В) ПЛР в реальному часі

**56. Флюорофори необхідні для:**

- А) гніздової-ПЛР
- Б) ЗТ-ПЛР
- В) ПЛР в реальному часі

**57.Збірка фагу M13 починається з:**

- А) шпильки на ДНК
- Б) утворенням на мембрані ініціюючого комплексу
- В) утворення вершин капсиду

**58.Збірка капсиду фагу T4 здійснюється:**

- А) після реплікації ДНК послідовно
- Б) після реплікації ДНК паралельно в трьох напрямках
- В) паралельно з реплікацією ДНК в трьох напрямках

**59. Морфогенез капсиду фага P22 починається з:**

- А) зі зв'язування капсидного білку gp5 з конкатемерною ДНК
- Б) з утворення прокапсиду за участі білку gp5
- В) зі синтезу конкатемерної ДНК та приєднання білку збірки gp8.

**60.Рецепторами для фагу M13 є:**

- А) компоненти ліпополісахаридного шару
- Б) F-пілі
- В) компоненти ліпопротеїдного шару

## Перерелік рекомендованої літератури

### *Основна:*

1. Calendar R.L. The Bacteriophages.-Oxford University press.-2006.-757pp.
2. Kutter E., Sulakvelidze A. Bacteriophages: Biology and Applications.- CRC Press.- 2004.- 528pp.
3. Acheson N.H. Fundamentals of molecular virology.- John Wiley & Sons.- 2007.- 432pp
4. 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.
5. Virus taxonomy. Classification and nomenclature of viruses. Ed. By M.H.V. van Regenmortel- Acad Press.- 2000.- 1147pp.
6. Лурия С., Дарнелл Дж., Балтимор Д., Кэмпбелл Э. Общая вирусология. – М. : Мир, 1981.- 680 с.
7. Молекулярная биология / Под ред. А.С. Спирина.- М. : Высшая школа, 1990.- 352 с.
8. Стент Г., Келиндер Р. Молекулярная генетика. – М. : Мир, 1981.- 648 с.
9. Molecular Basis of Virus Evolution / Ed. by A. Gibbs/- Univ.Press, Cambridhe, UK, 1995 – 603P.
10. Cann A.J. Principles of Molecular Virology. – London.: Academic Press, 2001.- 234P.
11. Mahy B.W.J. A Dictionary of Virology. – London.: Academic Press, 1997.- 348P.
12. Encyclopedia of Virology /Ed. by A. Granoff, R. Webster/ - Academic Press, San Diego, 2000.– 3252p.
13. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии: молекулярное клонирование./М., Мир, -1984, -с.479.
14. Френкель-Конрат Х. Химия и биология вирусов./М., Мир, -1972, -стр.74-82.

### *Додаткова:*

15. Сингер М., Берг П. Гены и геномы. В 2-х томах – М.: Мир, 1998.
16. Льюин Б. Гены.-М.: Мир, 1990.- 544 с.
17. Айала Ф., Кайгер Дж. Современная генетика: В 3т.- М.: Мир, 1987.-1001с.
18. Miller E.S., Kutter E., Mosig G. et al. Bacteriophage T4 genome // Microbiology and molecular biology reviews.-2003.- P.86-156.
19. Пташне М. Переключение генов. Регуляция генной активности и фаг  $\phi$ : Пер. с англ.-М.: Мир, 1989.- 160с.
20. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. М.: Мир.- 2002.- С. 179-247.
21. Алдерс Б., Брей Д., Льюис Дж. и др. Молекулярная биология клетки. В 3 томах.- М. : Мир, 1994.- 1565 с.
22. Вирусология. В 3т. /Под ред. Б. Филдса.- М. : Мир, 1989.- 1475р.
23. Жданов В.М. Эволюция вирусов.- М. : Медицина, 1990.- 376 с.