

Київський національний університет імені Тараса Шевченка  
Навчально-науковий центр "Інститут біології та медицини"  
Кафедра вірусології

МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ  
ДО ДИСЦИПЛІНИ «ВІРУСИ АРХЕЙ, МІКОПЛАЗМ ТА ЦІАНОБАКТЕРІЙ»  
ДЛЯ СТУДЕНТІВ ОР «МАГІСТР», ЩО НАВЧАЮТЬСЯ ЗА ОП «БІОЛОГІЯ»

КИЇВ 2022

Методичні рекомендації до дисципліни «Віруси архей, мікоплазм та ціанобактерій» для студентів освітнього рівня «Магістр», що навчаються за ОП «Біологія» ННЦ «Інститут біології та медицини»// Київський національний університет імені Тараса Шевченка.- Київ.- Упорядники: Шевченко Т.П., Будзанівська І.Г. – К.: ЦП «Компринт», 2022. – 39с.

Рецензенти: Сківка Л.М. – д.б.н., завідувачка кафедри мікробіології та імунології ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка

Загородня С.Д. – к.б.н., старший дослідник завідувачка відділу репродукції вірусів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України

*Рекомендовано до друку вченою радою Навчально-наукового центру "Інститут біології та медицини" Київського національного університету імені Тараса Шевченка (протокол № 4 від 15 листопада 2022 року)*

## ЗМІСТ

ВСТУП	4
ЗМІСТ ДИСЦИПЛІНИ	5
ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА	5
ОСНОВНІ ЕТАПИ РОЗВИТКУ ВЧЕННЯ ПРО ВІРУСИ АРХЕЙ, МІКОПЛАЗМ ТА ЦІАНОБАКТЕРІЙ	5
СУЧАСНА КЛАСИФІКАЦІЯ ВІРУСІВ АРХЕЙ, МІКОПЛАЗМ ТА ЦІАНОБАКТЕРІЙ	6
ПРИНЦИПИ СТРУКТУРНОЇ ОРГАНІЗАЦІЇ ВІРУСІВ АРХЕЙ, МІКОПЛАЗМ ТА ЦІАНОБАКТЕРІЙ	9
ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА ВІРУСІВ АРХЕЙ	12
ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА ВІРУСІВ МІКОПЛАЗМ	15
ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА ВІРУСІВ ЦІАНОБАКТЕРІЙ	23
МЕХАНІЗМИ СТІЙКОСТІ ПРОКАРІОТ ДО ВІРУСІВ. АНТИ-CRISPR	27
БІЛКИ ВІРУСІВ ПРОКАРІОТІВ	
ПРАКТИЧНА ЧАСТИНА	28
ВИДІЛЕННЯ ВІРУСІВ ЦІАНОБАКТЕРІЙ З ОТОЧУЮЧОГО СЕРЕДОВИЩА	28
ВИВЧЕННЯ МОРФОЛОГІЇ ВІРУСІВ ЦІАНОБАКТЕРІЙ	29
ВИВЧЕННЯ БІОЛОГІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ЦІАНОФАГУ	29
ВИВЧЕННЯ ОСНОВНИХ ПАРАМЕТРІВ ІНФЕКЦІЙНОГО ПРОЦЕСУ ВІРУСІВ МІКОПЛАЗМ ТА ЦІАНОБАКТЕРІЙ	30
МОЛЕКУЛЯРНІ МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ ВІРУСІВ ЦІАНОБАКТЕРІЙ	31
ЗАВДАННЯ ДЛЯ САМОСТІЙНОЇ РОБОТИ	33
КОНТРОЛЬНІ ЗАПИТАННЯ ДО МАТЕРІАЛУ СПЕЦКУРСУ	35
ПРИКЛАДИ ТЕСТОВИХ ПИТАНЬ	37
ПЕРЕЛІК РЕКОМЕНДОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	39

## ВСТУП

Мета посібника ознайомити студентів з основами дослідження вірусів архей, мікоплазм та ціанобактерій, особливостями взаємодії їх з чутливими господарями та характеристиками життєвих циклів. Сформуванати у студента здатність проводити системний аналіз комплексу властивостей вірусів архей, мікоплазм та ціанобактерій, які використовуються як таксономічні критерії для визначення виду вірусів. Вміти модифікувати та адаптувати вихідні протоколи методів для вивчення життєвих циклів вірусів архей, мікоплазм та ціанобактерій. Керуючись інформацією про структуру та життєвий цикл певних вірусів, користуючись стандартними методиками, вміти розробити схему експерименту з детекції вірусів архей, мікоплазм та ціанобактерій.

У посібнику наведені основні методи роботи з вірусами ціанобактерій, запропоновано методи виділення та накопичення ціанофагів для молекулярних досліджень.

Методичні рекомендації розроблені до дисципліни «Віруси архей, мікоплазм та ціанобактерій», яка є складовою освітньої програми професійної підготовки фахівців освітнього рівня «Магістр». Дисципліна висвітлює питання особливостей та різноманіття вірусів архей, мікоплазм та ціанобактерій, методів їх досліджень. Дисципліна покликана узагальнити уявлення студента про основні методи роботи із вірусами прокаріотів. Сформуванати систему здатностей та вмінь з особливостей взаємодії з чутливими господарями.

Для опанування матеріалу з дисципліни «Віруси архей, мікоплазм та ціанобактерій» у кінці методичних вказівок наведено рекомендований перелік літератури та тестових питань.

ЗМІСТ ДИСЦИПЛІНИ  
ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА  
ОСНОВНІ ЕТАПИ РОЗВИТКУ ВЧЕННЯ ПРО ВІРУСИ АРХЕЙ,  
МІКОПЛАЗМ ТА ЦІАНОБАКТЕРІЙ

На початку викладання дисципліни ознайомити студентів з ключовими моментами відкриття вірусів прокариотів, звертаючи увагу на відкриття вірусів, що інфікують архей, мікоплазм та ціанобактерій. Акцентувати увагу на тому, чому саме в цей період розвитку даної науки стали можливі ці відкриття.

Основні етапи розвитку вчення про віруси архей, мікоплазм та ціанобактерій.

- 1896 – Ернест Хенкін повідомив, що води рік Ганг і Джамна володіють антибактеріальною активністю по відношенню до холерного вібріону.
- 1898 – Гамалея Микола Федорович - перші спостереження лізису бактерій сибірської виразки, лізуючий агент названий бактеріолізином
- 1915 –Фредерік Туорт спостерігав лізис колоній стафілококу та довів термолабільність лізуючого фільтрату
- 1917 –Фелікс д'Ерель – повідомив, що фекальні маси хворих на дизентерію, профільтровані через фільтр Шамберлана володіють властивістю просвітлювати культуру дизентерійних бактерій у бульйоні. Агент був названий *Bacteriophageum intestinal*.
- 1933 – перші спроби визначення хімічного складу вірусів були зроблені Шлезінгером на прикладі бактеріофагу *E. coli*.
- 1936 – Грація запропонував метод агарових шарів для кількісного визначення фагів.
- 1938- Євгеній та Елізабет Вольман відкрили явище лізогенії.
- 1939 – Еморі Елліс та Макс Дельбрюк на прикладі фагу T2 поставили експеримент з одиночного циклу розвитку фага.
- 1941 – Руска вперше описав морфологію бактеріофагів за допомогою ЕМ

- 1942 – Лурія і Андерсон за допомогою ЕМ фаголізату встановлено, що кількість негативних колоній співпадає з кількістю фагових часток, що спостерігаються в ЕМ.
- 1952 – Альфред Херші і Маргарет Чейз на прикладі фагу T2 та *E. coli* встановили, що головну роль у зараженні бактерій фагом відіграє нуклеїнова кислота.
- 1963 - вивчення ціанофагів розпочалось з відкриття ціанофага LPP-1.
- 1977- Фредеріком Сенгером розшифрована послідовність одноланцюгової кільцевої молекули ДНК фагу фХ174 як вдалий об'єкт для вивчення мутацій.
- 1987 – вперше повністю секвеновано геном вірусу SpV4, що інфікує спіроплазми.
- 1990 - відкриті фаги морських ціанобактерій на прикладі представників що інфікують морські ціанобактерії роду *Synechococcus*.
- 2003 - Хемільтон Сміт і Клайд Хачісон вдалось відтворити ДНК фХ174 довжиною 5386 нуклеотидів.
- 2005 – доведена роль систем CRISPR-Cas у стійкості бактерій до бактеріофагів.
- 2009 – вперше відкритий вірус, що інфікує галофільні археї.
- 2020 - присуджена Нобелівська премія по хімії за впровадження методів редагування геномів за допомогою CRISPR-Cas9 (Емануель Шарпант'є та Дженіфер Дудна).

## СУЧАСНА КЛАСИФІКАЦІЯ ВІРУСІВ АРХЕЙ, МІКОПЛАЗМ ТА ЦІАНОБАКТЕРІЙ

Із відкриттям вірусів мікроорганізмів та збільшення кількості нових фагів потрібно було чіткі критерії класифікації. В основі класифікації закладені загальні принципи класифікації вірусів – це тип симетрії, структура віріона, тип геному, молекулярно-біологічна характеристика віріона та його

нуклеїнової кислоти, білків, ліпідів та вуглеводнів, серологічна та антигенна спорідненість тощо. Оскільки кількість відомих вірусів бактерій (фагів) збільшується, то вдосконалюються і критерії класифікації та з'являються нові родини.

Перша класифікація вірусів прокариотів створювалась відповідно до їх морфології. На початку потрібно згадати класифікацію Девіда Бредлі, який запропонував поділити вірусів прокариотів на 6 морфологічних груп за результатами електронної мікроскопії:

1. Фаги з відростком, чохол якого здатний до скорочення
2. Фаги з довгим відростком, що не скорочується
3. Фаги з коротким відростком
4. Фаги без відростка з великими капсомерами
5. Фаги без відростка з малими капсомерами
6. Ниткоподібні фаги.

У 1971 році ця система була офіційно прийнята Міжнародним комітетом з номенклатури вірусів (International Committee on Nomenclature of Viruses, ICNV). Згодом, у 1974 році, класифікація була вдосконалена Гансом-Вольфгангом Аккерманом та іншими вченими. Інші родини вірусів прокариотів, такі як *Inoviridae*, *Microviridae*, *Tectiviridae*, *Corticoviridae*, *Plasmaviridae*, *Leviviridae* і *Cystoviridae*, були прийняті у 1978 році. Назви добре відомих родин вірусів прокариотів, *Myoviridae*, *Podoviridae* і *Siphoviridae*, були прийняті Міжнародним комітетом з таксономії вірусів (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV) у 1981 та 1984 роках. У 1986 році Метьюз значно розширив критерії класифікації вірусів прокариотів. За цією класифікацією вірусів прокариотів поділяли на 10 родин. Один із перших порядків вірусів прокариотів, який об'єднав родини *Myoviridae*, *Podoviridae* і *Siphoviridae*, був порядок *Caudovirales* запропонований у 1998 р. Гансом-Вольфгангом Аккерманом.

З розвитком геноміки на початку 2000-х років секвенування геномів вірусів прокариотів виявило набагато більшу генетичну різноманітність, ніж

вважалося раніше, особливо у вірусів прокариотів, що належать до порядку *Caudovirales*. Це призвело до створення перших підродин у трьох родин вірусів зі змішаним типом симетрії: *Podoviridae*, *Myoviridae* та *Siphoviridae*.

Грунтуючись на цих доказах, підкомітет вірусів бактерій архей ICTV почав розплутувати мережу різних груп вірусів прокариотів, визначаючи нові родини на основі генома, такі як *Ackermannviridae*, *Chaseviridae*, *Herelleviridae*, *Demereciviridae*, *Autographiviridae*. На сьогодні скасовано порядок *Caudovirales* з автоматичним віднесенням усіх поточних представників до класу *Caudoviricetes*.

Змінилась класифікація і вірусів прокариотів з одноланцюговою ДНК. Багато років існувало тільки дві родини таких вірусів прокариотів: віруси зі спіральним типом симетрії та з геном представленим олДНК належали до родини *Inoviridae*, а віруси з ікосаедричним типом симетрії та з геном представленими олДНК належали до родини *Microviridae*. Згодом представники родини *Inoviridae* були розділені на дві родини - *Inoviridae* та *Plectroviridae*, які входять до порядку *Tubulavirales*, який також включає нову родину *Paulinoviridae*. Стосовно представників іншої родини вірусів прокариотів з геномом, що представлений олДНК. Для родини *Microviridae* було запропоновано впровадити додаткові підродини *Bullavirinae* та *Gokushovirinae*.

Стосовно вірусів архей, мікоплазм та ціанобактерій, досліджено, що більшість вірусів, які інфікують як прісноводних, так і морських ціанобактерій належать до родин вірусів зі змішаним типом симетрії. Віруси мікоплазм належать до вірусів геном яких представлений двохланцюговою ДНК так і одноланцюговою ДНК з різним типом симетрії. Віруси архей належать до більш широкого спектру родин, серед яких є родини з унікальною структурою: *Ampullaviridae*, *Bicaudaviridae*, *Fusellovirida*, *Guttaviridae* та інші.

Отже, класична таксономія вірусів прокариотів на рівні морфотипів була надзвичайно корисною протягом чотирьох десятиліть. Якщо навіть родини, засновані на морфології, зникнуть, морфотипи продовжуватимуть існувати, а

дескриптори, такі як міовірус і подофаг, завжди залишатимуться корисними. Завдяки поновленню інтересу до вірусів прокариотів та прогресу в технології секвенування існує гостра потреба в класифікації не тільки за типовими критеріями, а й на основі геному вірусів.

## ПРИНЦИПИ СТРУКТУРНОЇ ОРГАНІЗАЦІЇ ВІРУСІВ АРХЕЙ, МІКОПЛАЗМ ТА ЦІАНОБАКТЕРІЙ

Перед ознайомленням з принципами структурної організації вірусів архей, мікоплазм та ціанобактерій потрібно нагадати студентам, що основними структурними компонентами вірусної частинки – віріона – є нуклеїнова кислота та білок. За структурою віруси поділяють на прості, до складу яких входять тільки білки та нуклеїнова кислота, і складні, до складу яких входять білки, нуклеїнова кислота, а також ліпіди та вуглеводи. У складі вірусної частинки може існувати тільки один тип нуклеїнової кислоти – або ДНК, або РНК. Вірусні білки поділяють на структурні, які входять до складу віріонів та неструктурні, які до складу віріонів не входять. Капсид простого вірусу, чи нуклеокапсид складного, може мати ротаційно-трансляційну (спірально) симетрію, або ікосаедричну (кубічну). Принципи, які лежать в основі морфогенезу капсидів (нуклеокапсидів) переважної більшості вірусів є універсальними. Але поряд з іншими вірусами, віруси прокариотів мають ряд особливостей, притаманних тільки їм: мають змішаний тип симетрії; невідомі віруси прокариотів з “-“ РНК-геномом та наявність аномальних азотистих основ (наприклад, 5-оксиметилцитозин) у вірусній ДНК.

Віруси прокариотів мають різноманітні форми, типи симетрії та розміри.

Серед вірусів архей, мікоплазм та ціанобактерій широко розповсюджені віруси зі змішаним типом симетрії. На прикладі фагу Т4 детально вивчено морфогенез міоподібних фагів. Бактеріофаг Т4 складається з головки прикріпленої до хвостового відростку вкритого чохлам, який здатний до скорочення. Між головою та хвостовим відростком міститься конектор з

комірцем та короткими фібрилами. Закінчується хвостовий відросток базальною пластинкою з прикріпленими до неї довгими фібрилами. Збірка бактеріофага відбувається в трьох напрямках: збірка капсиду, збірка хвостового відростку та збірка довгих хвостових фібрил. Після запоковування геному фага до капсиду, приєднується хвостовий відросток та довгі фібрили.

Морфогенез подоподібних вірусів детально вивчено на прикладі фагу T7. Збірка вірусної частки починається з трьох капсидних білків, які разом з одним білком-шапероном утворюють субодиницю, яка надалі димеризується і перетворюється у асиметричний гексамерний капсомер (гексамер). Капсомери збираються у прокапсид, утворюючи ікосаедричний каркас. N-кінець капсидного білку знаходиться всередині прокапсиду. Надалі, на стадії прокапсиду починається упаковка ДНК при цьому білки-шаперони витісняються з капсиду через центральні отвори гексамерів капсидного білку, що веде до збільшення об'єму капсиду. Після втрати білків-шаперонів капсидні білки підлягають конформаційним змінам, внаслідок яких утворюються симетричні гексамери, які стабілізуються новоутвореними внутрішніми нековалентними зв'язками. Основні конформаційні зміни відбуваються на N-кінці мажорного капсидного білка, які забезпечує міцні зв'язки між сусідніми капсомерами, що призводить до дозрівання капсиду.

Віруси архей є найбільш загадковими представниками віросфери. Більшість охарактеризованих вірусів архей інфікують екстремофільних господарів і демонструють дивовижну різноманітність морфотипів віріонів, багато з яких ніколи не спостерігалися серед бактеріофагів або вірусів еукаріот. Проте нещодавні дослідження навколишнього середовища показали, що віруси архей широко поширені також у помірних екосистемах, де вони відіграють важливу екологічну роль. Загалом збірка вірусів архей класичної морфології точно відповідає механізмам, що використовуються еволюційно спорідненими вірусами бактерій та еукаріот, підкреслюючи загальне збереження цих шляхів протягом мільярдів років еволюції.

Крім вірусів зі змішаним типом симетрії, потрібно навести приклади збірки вірусів з ікосаедричним типом симетрії на прикладі представника родини *Turriviridae* *Sulfolobus turreted icosahedral virus* (STIV), представника родини *Sphaerolipoviridae* *Haloarcula hispanica icosahedral virus 2* (HHIV-2) та представника родини *Portogloboviridae* *Sulfolobus polyhedral virus 1* (SPV1).

Також можна навести приклад збірки вірусів архей зі спіральним типом симетрії родини *Rudiviridae*: *Sulfolobus islandicus rod-shaped virus 2* (SIRV2).

У цій темі доцільно вказати і про морфогенез вірусів архей з унікальною морфологією, які використовують унікальні механізми збірки віріонів. Наприклад, веретеноподібні віруси широко поширені в середовищах, де домінують археї і належать до родини *Fuselloviridae*. Один з представників цієї родини *Sulfolobus spindle-shaped virus 1* (SSV1), морфогенез якого завершується під час виходу з клітини шляхом брунькування. Інша родина вірусів архей, що мають унікальну морфологію, це родина *Bicaudaviridae*. Типовий представник цієї родини *Acidianus two-tailed virus* (ATV), який має хвостові відростки різної довжини на одному або обох загострених кінцях лимоноподібної вірусної частки. Завершення морфогенезу віріонів *Bicaudaviridae* також, ймовірно, відбувається за межами клітини. При цьому *Acidianus two-tailed virus* (ATV), піддається морфологічній трансформації поза клітиною-хазяїном і незалежно від неї, так як віріони ATV вивільняються з клітини-хазяїна у вигляді веретеноподібних частинок без хвостових відростків, які розвиваються позаклітинно і утворюють довгі хвости на обох кінцях веретеноподібного віріону при температурі природного середовища існування, тобто 85°C.

Незважаючи на значний прогрес протягом останніх кількох років, віросфера архей продовжує представляти одну з найменш вивчених частин глобального вірому з багатьма молекулярними особливостями, які очікують на відкриття та характеристику.

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА ВІРУСІВ АРХЕЙ

Процес інфікування вірусами клітини прокаріотів може призводити до трьох типів взаємодії: літичної, нелітичної (хронічної) і лізогенної. Крім того, інколи для життєвих циклів вірусів ціанобактерій використовується термін «псевдолізогенія», коли має місце подовжений латентний період при літичній (вірулентній) інфекції.

Літична взаємодія вірусу з клітиною прокаріотів завжди завершується загибеллю мікробної клітини і утворенням вірусного потомства. Даний тип взаємодії ще носить назву продуктивної взаємодії, а такі віруси – літичними або вірулентними. Типовим прикладом такої взаємодії є бактеріофаг T4 та бактерія *E. coli*. При нелітичній (хронічній) взаємодії вірусу з клітиною прокаріотів відбувається часткова перебудова клітинного метаболізму для повільного розмноження вірусу. Віріони виходять із клітини, не вбиваючи її. Типовим прикладом нелітичного фага є нитчастий фаг M13. Цей тип взаємодії зустрічається у вірусів мікоплазм.

При лізогенній взаємодії вірусу з клітиною прокаріотів вірусний геном в неінфекційній формі (у вигляді профага) передається від батьківських клітин дочірнім (від однієї генерації клітин до іншої). При цьому час від часу в деяких клітинах даної культури синтезуються вірусні частки, які лізують ці клітини і виходять у навколишнє середовище. Віруси, які здатні лізогенізувати чутливі клітини прокаріотів, називаються помірними або лізогенними. Типовим прикладом такої взаємодії є бактеріофаг  $\lambda$  та штам *E. coli* K12. Такий тип взаємодії характерний як для вірусів мікоплазм так і для вірусів ціанобактерій.

Життєвий цикл вірусу прокаріотів складається з декількох етапів:

- Екліпс-фаза – протягом даної фази не детектуються вірусні частки всередині клітини. Нуклеїнова кислота «перелаштовує» біосинтетичну машинерію клітини на продукування фагових мРНК та білків. Ранні мРНК кодують білки, необхідні для синтезу фагової ДНК та для відключення

синтезу клітинних мРНК, ДНК та білків. Інколи ранні вірусні білки викликають деградацію клітинної хромосоми. Після синтезу вірусної ДНК синтезуються пізні вірусні мРНК та білки, які є структурними або необхідними для виходу з клітини.

- Фаза внутрішньоклітинного накопичення віріонів – вірусна ДНК та білки асемблюються в інфекційні вірусні частки в клітині.
- Фаза лізису та виходу – накопичення віріонів та, іноді, білків лізису призводить до лізису клітини, внаслідок чого вірусні частки вивільняються у середовище. Деяким вірусам архей властивий вихід брунькуванням.

Серед вірусів архей відомі види, які здатні інфікувати представників всіх трьох головних фенотипових груп архей: екстремальних галофілів, екстремальних термофілів та метаногенів. Хазяями усіх відомих вірусів кренархей є представники родів гіпертермофілів *Sulfolobus*, *Acidianus*, *Thermoproteus* та *Pyrobaculum*. До перших двох родів відносяться екстремальні ацидофіли, а всі представники інших двох родів є нейтрофілами та облігатними анаеробами. На здатність *Thermoproteus* та *Pyrobaculum* до інфікування вірусами не впливає кисень. Для всіх клітин-хазяїв найбільш ефективний перебіг вірусної інфекції відбувається саме за оптимальних для росту хазяя температур. Механізми проникнення вірусів до чутливих клітин та збірки вірусів у клітинах маловідомі. Спроби дослідити адсорбцію вірусів за допомогою електронної мікроскопії не були успішними. За звичай, віруси ацидофільних гіпертермофілів є нелітичними, і інфіковані клітини постійно продукують вірусні частки по досягненні рівноваги між реплікацією вірусу у клітині та розмноженням самої клітини. Дані віруси стабільно персистують у клітинах, і клітини не позбавляються їх навіть протягом тривалого зростання у культурі. Така стратегія виживання, очевидно, є вигідною для популяції вірусу для уникнення прямого пролонгованого впливу суворих умов довкілля.

### **Родина: *Clavaviridae***

*Clavaviridae* - родина ДНК-вірусів, що уражують археї. Вперше була описана групою дослідників у 2010 році. До складу родини входить один рід *Clavavirus*. Типовий представник: *Aeropyrum pernix bacilliform virus 1*.

#### **Морфологія, молекулярні та фізико-хімічні властивості.**

Жорсткі паличкоподібні вірусні часточки, близько  $140 \times 20$  нм, без суперкапсиду. Один кінець загострений, а інший заокруглений. Віріони повністю розкладаються при обробці 0,1% SDS чи 50% ізопропанолом протягом 5 хв. при 37°C, але залишаються неушкодженими і зберігають інфекційність при обробці 50% або 70% етанолом в тих же умовах. Віріони APBV1 дуже термостабільні. Вони зберігають інфекційність після інкубації протягом 3 год. при 100°C. Тим не менш, вони втрачають інфекційність після 24 год. інкубації при температурі 90°C або після 20 хв. в автоклаві при 120°C. Генгм представлений кільцевою длДНК розміром 5278 пн. Геном є найменшим для длДНК вірусів архей і бактерій.

#### **Життєвий цикл**

Інфікує термофільних архей роду *Aeropyrum*, порядку *Desulfurococcales*. Зараження цим вірусом, не викликає лізису клітин господаря.

### **Родина *Pleolipoviridae***

До складу родини входить три роди *Alphapleolipovirus*, *Betapleolipovirus*, *Gammapleolipovirus*. Типовим представником є *Halorubrum pleomorphic virus 1* (HRPV-1)

#### **Морфологія, молекулярні та фізико-хімічні властивості.**

Плеоморфні вірусні частки розміром від  $41.1 \pm 2.2$  nm -HRPV-1 до  $70.6 \pm 3.6$  nm - His2. Геном представлений кільцевою олДНК 7.0 to 10.6 kb (8 -16 ORF)

#### **Життєвий цикл**

Віріони адсорбуються на клітині господаря і геномна ДНК потрапляє в цитоплазму клітини. олДНК конвертує в длДНК, що є реплікативною формою

вірусу. Транскрипція ранніх генів відбувається за рахунок РНК полімерази господаря. Геном реплікується, шляхом кільця що котиться. Вихід вірусу здійснюється шляхом брункуванням (нецитолітичні віруси).

### **Родина *Tristromaviridae***

До складу родини входить один із родів рід *Betatristromavirus* представником якого є вірус *Thermoproteus virus 1* (*Betatristromavirus TTV1*).

### **Морфологія, молекулярні та фізико-хімічні властивості**

Віріони складаються з суперкапсиду та нуклеокапсиду. Віріони паличкоподібні та жорсткі. Мають вирости, які проходять від серцевини через суперкапсид, що має асиметричну будову. Розмір віріонів становить 24-38 нм у діаметрі та 410-1950 нм у довжину з суперкапсидом, який щільно прилягає. Суперкапсид не має поверхневих шипів. Нуклеокапсид видовжений та має спіральну симетрію. Геном представлений двохланцюговою ДНК. Віріон містить 4 білки молекулярної маси 12,9 – 24,5 кДа, Два білки є ДНК асоційованими і формують нуклеокапсид разом з ДНК. Третій білок є білком суперкапсиду. Суперкапсид містить такі ліпіди як і у хазяїна, суперкапсид має двошарову структуру. Вуглеводи є у складі гліколіпідів.

### **Життєвий цикл**

Адсорбція та інфекція відбувається шляхом взаємодії господаря з термінальними виступами віріону. Повна неінтегрована вірусна ДНК існує у клітині в лінійній формі, віріони вивільняються шляхом лізісу, інфекція може бути латентною. Коло господарів обмежене до двох видів архей.

## **ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА ВІРУСІВ МІКОПЛАЗМ**

Мікоплазми - прокаріотичні організми, позбавлені істинної клітинної стінки і не здатні синтезувати її компоненти. Як і інші живі організми мікоплазми інфікуються вірусами. Припущення про існування вірусів мікоплазм, що були висловлені ще в 60-х роках, були підтверджені

виділенням вірусу *Acholeplasma laidlawii*, що утворював негативні колонії на суцільному газоні цієї мікоплазми. Серед них найбільш вивченими є віруси, які інфікують представників родів *Acholeplasma*, *Spiroplasma* та *Mycoplasma*.

Усі виділені віруси мікоплазм є ДНК-вмісними вірусами. За своєю структурою віруси мікоплазм, що містять одноланцюгову ДНК можуть бути як ниткоподібними, ікосаедричними або квазісферичними. Віруси мікоплазм, що містять двохланцюгову ДНК мають змішаний тип симетрії і, за звичай, короткий хвостовий відросток, хоча зустрічаються окремі представники і з довгим хвостовим відростком. Відсутність у мікоплазм клітинної стінки означає, що етап адсорбції вірусу має нагадувати адсорбцію вірусів тварин (тобто адсорбція на клітинній мембрані), а не бактеріофагів (тобто адсорбція до клітинної стінки або позаклітинних бактеріальних структур). Адсорбція вірусів залежить від багатьох факторів, в тому числі від присутності дивалентних катіонів, рН, температури. Згідно з загальною думкою дослідників, більшість вірусів мікоплазм не мають строгої специфічності до певних видів мікоплазм. Наприклад, вірус MVL3, який було виділено з *Acholeplasma laidlawii*, здатний розмножуватись в клітинах *A. oculi*. Аналогічним чином віруси SPV1 та SPV3 можуть розмножуватись на різних видах *Spiroplasma*. У той час клітини *Acholeplasma laidlawii* не вдається інфікувати вірусами з роду *Mycoplasma*. Швидше за все неспецифічність вірусів мікоплазм обмежуються в межах роду. У середині деяких видів мікоплазм виявлені штамові відмінності по чутливості до того чи іншого вірусу. Крім того, в культурі мікоплазми, що інфікована вірусом, виявляються неінфіковані, але чутливі до цього вірусу клітини. Є кілька причин резистентності мікоплазм до вірусів: фізіологічний стан клітин мікоплазм в несинхронізованій культурі; відсутності рецепторів адсорбції (адгезинів) вірусу на мембрані клітини-хазяїна; відмінності в ліпідних складах мембран вірусу та хазяїна; конформаційні зміни білків, що приймають участь в процесах адсорбції.

У цьому розділі доцільно розглянути таких представників, як

Acholeplasma phage L51, Acholeplasma phage L2, Spiroplasma phage SpV-1, Spiroplasma phage SpV-3 та Spiroplasma phage SpV-4.

**Acholeplasma phage L51 (Plectrovirus L51)** належить до роду *Plectrovirus* родини *Plectroviridae* порядку *Tubulavirales*.

### **Морфологія, молекулярні та фізико-хімічні властивості**

Віріони кулеподібні, без суперкапсиду, розміром 14 x 71 нм. Один кінець віріону заокруглений, інший плаский або неправильної форми. Віріони характеризуються спіральною симетрією.

Фаг L51 є типовим представником роду *Plectrovirus* (малі ниткоподібні фаги) родини *Inoviridae* (ниткоподібні фаги с одноланцюговою ДНК).

Віріони стійкі до дії неіонних та іонних детергентів, ДНКаз I та пронази, і відносно стійкі до дії високої та низької температури. При цьому віріони досить легко інактивуються УФ-світлом.

Геном фагу L51 представлений кільцевою одноланцюговою ДНК розміром 4.3-4.5 т.о. Очищені віріони містять 4 білки масою 70, 53, 30 та 19 кДа, в той час як у послідовності геному L51 закодовані 4 прогнозовані білки масою 31, 23, 19 та 12 кДа. Причини таких відмінностей у прогнозованих та фактично знайдених білках наразі невідомі.

### **Життєвий цикл**

На початкових етапах взаємодії практично всі «зіткнення» віріонів з клітиною призводять до їх адсорбції. Тим не менше, лише незначна частка фагів абсорбується на функціонально активних сайтах: на них абсорбуються лише 10-20 фагів з 300 (3-6%). Вважається, що рецепторами для фагу L51 можуть слугувати різні типи макромолекул на клітинній мембрані.

Реплікація відбувається у 3 етапи:

1) Синтез комплементарного ланцюгу ДНК – утворення проміжної реплікативної форми (дволанцюгової ДНК). Даний процес відбувається одночасно з проникненням фагу L51 за рахунок клітинних білків.

2) Реплікація проміжної реплікативної форми шляхом «кільця, що

котиться» - накопичення проміжних реплікативних форм (дволанцюгової ДНК). Даний процес відбувається за рахунок клітинних та вірусних білків.

3) Синтез геномних одноланцюгових ДНК вірусу з проміжних реплікативних форм за рахунок асиметричної реплікації ДНК.

Вірус L51 характеризується нецитотичним інфекційним циклом, який призводить до персистентної інфекції клітин. Інфіковані клітини ростуть повільніше за здорові та утворюють менші за розміром колонії (що, вірогідно, є причиною утворення напівпрозорих бляшок, викликаних вірусом L51). Популяційні дослідження свідчать на користь того, що у природі переважають штами *A. laidlawii*, які персистентно інфіковані L51-спорідненими фагами.

Крива поодинокого циклу розвитку клітин *A. laidlawii*, інфікованих вірусом L51, характеризується латентним періодом у 10-15 хв, за яким слідує лог-фаза (збільшення БУО) у 2-3 год. Вихід вірусу через 2-3 години після адсорбції становить 150-200 часток.

Збірка фагових часток та їх вихід з клітини є пов'язаними процесами. Після 2-3 годин темп виходу вірусу сповільнюється, але його концентрація поступово підвищується, зменшення кількості БУО не спостерігається.

*Acholeplasma phage L2* (*Acholeplasma laidlawii* phage L2, *Plasmavirus L2*) належить до роду *Plasmavirus* родини *Plasmaviridae*.

### **Морфологія, молекулярні та фізико-хімічні властивості**

Віріони мають суперкапсид, нуклеопротеїновий комплекс та серцевину, або капсид. Форма віріонів варіює від сферичної до плеоморфної; часто трапляються сферичні структури без серцевини (віріони без ДНК в електронному мікроскопі виглядають як електронно-прозорі частки). Розмір віріонів – 80 нм (50-125 нм); суперкапсид нещільно прилягає і нагадує мішкоподібну мембрану.

Серцевина сферична, містить нуклеопротеїновий комплекс; в електронному мікроскопі її структура не виявляється. Ультратонкі зрізи

вірусних часток показали наявність у серцевини ліпідно-білкової оболонки та асиметричної конденсації нуклеопротеїну. Генوم конденсований.

Віріони чутливі до обробки ефіром, неіонними детергентами (Brij-58, Triton-X та Nonidet P-40), хлороформом і температурою. Опромінення не впливає на інфекційність (після УФ-опромінення віріони можуть бути реактивовані у клітинах-хазяїнах за допомогою систем ексцизиї та SOS-репарації ДНК), однак інфекційність зменшується при обробці протеазами.

Геном несегментований та містить одну молекулу кільцевої суперспіралізованої дволанцюгової ДНК. Повний геном має розмір 12000 пн. ДНК секвенована. Вміст ГЦ-пар – 32%. Генوم кодує структурні білки. Принаймні 4 структурні білки розташовані в суперкапсиді віріону.

Ліпіди є і розташовані у суперкапсиді. Склад вірусних і клітинних ліпідів подібний. Вірусні ліпіди походять з клітинних мембран. Ліпіди у вірусній мембрані формують двошарову структуру.

### **Життєвий цикл**

Ефективність адсорбції становить лише 0.1-10%. Клітинні рецептори, необхідні для адсорбції фагу L2, невідомі. Вважається, що після адсорбції відбувається злиття мембран вірусу та клітини, і вихід конденсованого нуклеопротеїну віріону до клітини з наступним «роздяганням».

Крива одиночного циклу розвитку вірусу L2 характеризується латентним періодом у 1-2 год, за яким слідує фаза поступового збільшення кількості новоутворених фагових часток, яка триває 6-10 год. Збірка фагових часток та їх вихід з клітини є пов'язаними процесами. Протягом 10 год після інфікування з клітини виходить 100-1000 новоутворених фагових часток, в залежності від штаму клітин. Вихід відбувається шляхом брунькування.

Реплікація ДНК є двонаправленою і відбувається з двох сайтів. Після першого раунду реплікації вірусного геному вихідна нуклеїнова кислота може перейти у латентний стан. Унікальність життєвого циклу фагу L2 полягає у продуктивній нецитолітичній інфекції, яка практично завжди супроводжується лізогенією.

Через 2-4 год після інфікування кільцева геномна ДНК фагу L2 інтегрує до унікального сайту клітинної хромосоми. З причини наявності білка-репресора, лізогенні клітини стійкі до суперінфікування гомологічним вірусом, але сприйнятливі до ураження гетерологічним вірусним агентом.

Латентна інфекція може бути індукована УФ-опроміненням або мітоміцином-С.

**Spiroplasma virus SpV4 (Spiromicrovirus SpV4)** належить до роду *Spiromicrovirus* родини *Microviridae* порядку *Petitvirales*.

### **Морфологія, молекулярні та фізико-хімічні властивості**

*Spiroplasma SpV4* був виділений з *Spiroplasma melliferum*. Віріони ікосаедричні (T=1) діаметром 27 нм без суперкапсиду, містять одноланцюгову кільцеву ДНК розміром 4421 пн.

Віріони стійкі до дії неіонних та іонних детергентів, ДНКазі I та пронази, і відносно стійкі до дії високої та низької температури. При цьому віріони досить легко інактивуються УФ-світлом.

### **Життєвий цикл**

Крива одиночного циклу розвитку вірусу SpV4 характеризується латентним періодом у 1-2 год, за яким слідує фаза поступового збільшення кількості новоутворених фагових часток, яка триває 4 год. Вихід вірусу складає 100-200 вірусних часток на одну інфіковану клітину. SpV4 має нелітичний, продуктивний інфекційний цикл.

## **ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА ВІРУСІВ ЦІАНОБАКТЕРІЙ**

Вивчення вірусів ціанобактерій тісно пов'язане з вивченням екологічного значення їх господарів. Ціанобактерії є однією з найрізноманітнішою і широко розповсюдженою групою еубактерій на планеті. Ціанобактерії існують у широкому спектрі прісноводних і морських

середовищах та роблять значний внесок у підтримку атмосфери Землі з точки зору виробництва кисню і фіксація вуглекислого газу. Також, фаги опосередковують горизонтальний перенос генетичного матеріалу між господарями, впливаючи тим самим на генетичне різноманіття мікробних спільнот.

Назви вірусів, що інфікують ціанобактерії змінювались протягом десятиліть, спочатку їх називали «BGA (blue-green algae) - вірус», потім «фіковірус», «альговірус», «альгофаг» і, на сьогодні, віруси, які інфікують ціанобактерій носять назву «ціанофаг».

Ціанофаги належать до вірусів зі змішаним типом симетрії, тобто мають капсид, який містить двохланцюгову ДНК та хвостові відростки, які можуть бути різної довжини у різних видів ціанофагів.

Номенклатура ціанофагів суперечлива. Спочатку номенклатура базувалась на господарі ціанофага, але за цією назвою не можна було сказати про таксономічну приналежність фага. У 2000 р. запропонували називати ціанофаги за схемою Xx – YYZaa, де:

Xx – перші літери роду та виду господаря,

YY- відображають регіон відбору,

Z – родина вірусу (M = *Myoviridae*, S = *Siphoviridae*, P = *Podoviridae*),

aa – номер ізоляту.

Наприклад:

Ma-LBP інфікує *Microcystis aeruginosa* вперше знайдений в озері Baroon (Австралія), подібний до T7 (*Podoviridae*).

Але на сьогодні, ця номенклатура не була повністю прийнята і тому сучасна номенклатура ціанофагів це результат суміші різних номенклатур.

Вивчення ціанофагів розпочалось з відкриття ціанофага LPP-1, що викликав лізис кількох видів прісноводних ціанобактерій, представників родів *Lyngbya*, *Plectonema* і *Phormidium*. Перші морські ціанофаги морських штамів *Synechococcus*.

До *Cyanomyovirus* належать такі представники як AS-1, N-1 та Ma-LMM01. Розмір геному даних вірсів знаходиться в межах 37-200 тпо. AS-1 інфікує представників роду *Anacystis* і за структурою подібний до T4. AS-1 має ізометричну головку 90 нм в діаметрі і хвостовий відросток 22 нм × 244 нм

N-1 може бути літичним або лізогенним для деяких штамів родів *Anabaena* та *Nostoc*, має ізометричну головку 60 нм в діаметрі і хвостовий відросток 22 нм × 100 нм. Ma-LMM01 був вперше виділений з японського озера Mikata та інфікує представників роду *Microcystis*, має ізометричну головку 85 нм в діаметрі і хвостовий відросток 24 нм × 209 нм.

До *Cyanosiphovirus* належить ціанофаг SM-2, який інфікує *Synechococcus elongatus*, має ізометричну головку 50 нм в діаметрі і хвостовий відросток 200 нм та S-2L також інфікує представників роду *Synechococcus*, але має інші розміри, а саме ізометричну головку 56 нм в діаметрі і хвостовий відросток 120 нм. Геном представників *Cyanosiphovirus* варіює від 40 до 100 тпн. Вміст ГЦ-пар ціаносифофагів вищий за такий у ціаноміофагів.

До *Cyanopodovirus* належить ціанофаги LPP-1, SM-1, Ma-LBP. LPP-1 інфікує представників родів *Lyngbya*, *Plectonema*, *Phormidium*. LPP-1 має ізометричну головку діаметром 59 нм і хвостовий відросток розміром 15 нм × 20 нм, складається з 10 структурних білків. SM-1 інфікує представників родів *Synechococcus* і *Microcystis*, має ізометричну головку 90 нм в діаметрі. Ma-LBP інфікує *Microcystis aeruginosa* вперше знайдений в озері Varoon (Австралія), подібний до T7. Результати досліджень встановили, що цей ціанофаг може бути основним природним механізмом контролю над поширеністю *M. aeruginosa* у водних екосистемах, таких як озеро Барун.

Фаги адсорбуються на клітину господаря шляхом високоспецифічного зв'язування з рецепторами на поверхні клітини. Намає інформації стосовно природи рецепторів *Synechococcus*. Сонячне випромювання є головним фактором деструкції фагів у відкритому океані, але адсорбція фагів до різноманітних часток у воді слугує неспецифічним захисним механізмом

фагів. Було підраховано, що в берегових водах 80% бактеріальних клітин *Synechococcus* будуть контактувати з фаговими частками, але лише 1% таких контактів призведе до літичної інфекції, причиною цього може бути брак часу для адсорбції фагу на клітині у водному середовищі.

Окрім звичних циклів розвитку вірусів прокаріотів, таких як літичний та лізогенний, в якості альтернативи розвитку є шлях псевдолізогенії. Псевдолізогенія є формою взаємодії фага та клітини-хазяїна, за якої нуклеїнова кислота фага довгий період часу знаходиться в організмі хазяїна в неактивному стані. Псевдолізогенію можна визначити як стадію зупинки розвитку бактеріофага (подовжений латентний період) у чутливій клітині без реплікації генома фага. Це явище зазвичай спричинене несприятливими умовами росту для клітини-господаря (такими як голодування) і припиняється, коли умови росту покращуються. Псевдолізогенія все частіше розглядається як важливий аспект взаємодії фаг-господар. Причиною цього здебільшого є підвищений інтерес до взаємодії фагів і господарів у природному середовищі, зокрема серед морський прокаріотів. Псевдолізогенія, відіграє важливу роль у виживанні фагів, коли прокаріоти у природному середовищі голодують або їхній ріст дуже повільний.

Ціанобактерії демонструють біологічні ритми як пристосування до щоденного циклу світло-темрява. Світло має вирішальне значення для ціанофагів. Перший етап інфікування адсорбція деяких ціанофагів до клітин-господарів залежить від світла. На реплікацію ціанофагів впливає інтенсивність світла і, можливо, клітинний цикл господаря. У геномах ціанофагів виявлено гени фотосинтезу та метаболізму вуглецю. З цими генами ціанофаги можуть впливати на метаболічний ритм господаря. Польові дослідження показують, що зараження ціанофагами ціанобактерій у водних середовищах прямо чи опосередковано синхронізується із циклом світло-темнота. Щоденний цикл світло-темнота формує взаємодію ціанофагів і ціанобактерій та впливає на перетворення речовини та енергії у водних середовищах.

Ціанофаги є важливим компонентом мікробної харчової мережі, а також здійснюють контроль над усіма біотичними компонентами мікробної петлі. Шлях вірусного шунтування - це механізм, який запобігає (прокаріотичним та еукаріотичним) морським мікроорганізмам мігрувати на трофічні рівні, переробляючи їх у розчинену органічну речовину (РОР), яка може бути легко засвоєна мікроорганізмами. Вірусне шунтування допомагає підтримувати різноманітність всередині мікробної екосистеми, заважаючи одному виду морських мікробів домінувати над мікросередовищем. РОР, що переробляється шляхом вірусного шунтування, є порівнянним із кількістю, яку генерують інші основні джерела морської РОР. Віруси можуть легко заражати мікроорганізми в мікробній петлі через їх відносну чисельність порівняно з мікробами. Загибель прокаріотів та еукаріотів сприяє переробці поживних речовин вуглецю шляхом лізису клітин. Є також дані про регенерацію азоту (зокрема, амонію). 25% первинної продукції фітопланктону у світовому океані може бути перероблено в мікробну петлю шляхом вірусного шунтування.

## МЕХАНІЗМИ СТІЙКОСТІ ПРОКАРІОТ ДО ВІРУСІВ АНТИ-CRISPR БІЛКИ ВІРУСІВ ПРОКАРІОТІВ

Для вірусів прокаріотів, як і для інших вірусів, притаманні перегони з чутливими організмами за виживання. У результаті цих перегонів, клітини розвивають ефективний та складний противірусний захист, у свою чергу віруси розробляють механізми втечі від цього захисту.

Основні механізми захисту прокаріотів від чужорідної генетичної інформації включають:

- Системи рестрикції-модифікації (Restriction-Modification, RM)
- CRISPR/Cas-системи
- Системи абортівної інфекції

Система рестрикції-модифікації є захисним механізмом, присутнім у понад 90% послідовних бактеріальних та археальних геномів, складається з модифікованого ферменту, який метилює специфічну послідовність ДНК в геномі та ендонуклеази, яка розщеплює ДНК, що не має цього метилування.

Фаги можуть уникати цього захисту, так як деякі віруси кодують власну метилтрансферазу, щоб захистити свій геном від рестрикційних ферментів хазяїна. Бактеріофаг T7 кодує білок OCR, який блокує активний сайт кількох рестрикційних ферментів, імітуючи фосфатну основу ДНК. Інші бактеріальні віруси використовують аномальні азотисті основи, щоб уникнути дії рестриктаз.

Система абортивної інфекції (Abortive Infection Systems - Abi) у прокариотів містить противірусні захисні механізми, які призводять до загибелі клітини господаря, запобігаючи подальшому поширенню збудника інфекції. Системи Abi можуть бути опосередкованими клітинними токсинами, які активуються при вірусній інфекції впливаючи як на вірус, так і на клітину-господаря. Переважна більшість токсинів перешкоджає трансляції, переважно через розщеплення мРНК або тРНК. Віруси прокариотів розробили різні механізми для запобігання цьому типу захисту хазяїна. Так як противірусні токсини прокариотів є частиною системи токсин-антитоксин, у якій токсин зазвичай утримується в неактивному стані антитоксином, деякі віруси прокариотів синтезують сполуки, які імітують молекулу антитоксину, щоб захистити себе від негативного впливу активації токсину.

Система Rex є прикладом двокомпонентної системи абортивної інфекції.

Неактивна форма RexA, активується комплексом «фаговий білок – ДНК», який утворюється як проміжний продукт реплікації або рекомбінації при вірусній інфекції. Два активовані білки RexA необхідні для запуску мембрано-асоційованого білка RexB, який діє як іонний канал і дозволяє проходити одновалентним катіонам через внутрішню мембрану бактерії, руйнуючи мембранний потенціал і вбиваючи клітину, а разом з нею і вірус. Адаптивний імунний захист прокариотів від вірусів також опосередковується

системою CRISPR-Cas. Групи коротких паліндромних повторів, перемежованих із унікальними послідовностями CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) записані до бактеріального геному як згадки про бактеріофагів, які колись потрапляли в клітину. І хоча різноманіття цих комплексів починалось з трьох типів систем CRISPR-Cas, на сьогодні, спираючись на будову білкових комплексів розпізнавання CRISPR/Cas системи поділяють на 2 класи: клас 1- комплекс розпізнавання утворений кількома субодиницями і декількома Cas білками, клас 2 - комплекс розпізнавання представлений одним багатодоменним білком. Класи систем CRISPR / Cas у свою чергу поділяють на кілька типів. До класу 1 відносяться типи I, III і IV, а до класу 2 - типи II, V і VI. В основу поділу типів в рамках класів покладена різниця в ендонуклеазах. Типи, в свою чергу, діляться на підтипи, що розрізняються особливостями будови локусу CRISPR і, в деяких випадках, наявністю унікальних білків Cas. У ході дослідження CRISPR виявлено, що системи CRISPR-Cas мають упереджений розподіл між археями та бактеріями. Системи I типу CRISPR-Cas поширені в обох прокариотичних доменах, усі відомі системи класу 2 CRISPR-Cas походять від бактерій, хоча деякі системи класу 2 є у архей (системи типу V у еуархеї *Methanomethylophilus* і системи типу II у некультивованих наноархей), крім того, археї мають набагато більше систем типу III, ніж бактерії.

Архей екстремофіли містять більше однієї системи CRISPR-Cas, що може свідчити про те, що системи CRISPR-Cas здатні виконувати деякі додаткові функції, важливі для певних фізіологічних груп організмів.

Для подолання систем CRISPR-Cas у вірусів прокариот знайдено та описано 22 родини анти-CRISPR білків, більшість з них для CRISPR/Cas I та II типів. Послідовності білків анти-CRISPR не мають загального мотиву. Однак виявилось, що оточення генів анти-CRISPR дуже схоже: у всіх них після власне генів анти-CRISPR знаходиться ген, що кодує транскрипційні фактор під назвою Aca1 (Anti-CRISPR associated 1). Фаги, які не мають генів анти-CRISPR, не мають і гена *aca1*. Гени анти-CRISPR і ген *aca1* утворюють єдиний

оперон, а білок Aca1, мабуть, регулює експресію анти-CRISPR згідно стадії інфекційного циклу фага. Білок Aca1 має структурний мотив «спіраль-поворот-спіраль», часто зустрічається серед транскрипційних факторів. Щоб встановити, які гени бактеріофага є білками анти-CRISPR, перевіряли наявність генів, що кодують білки з мотивом «спіраль-поворот-спіраль». За допомогою такого підходу знайдені білки анти-CRISPR, що діють проти систем I та II типів. Білки анти-CRISPR служать факторами еволюції прокариотів. Так, як вбудовування мобільних генетичних елементів з генами таких білків в геном бактерії призводить до постійної інактивації систем CRISPR-Cas через стабільну експресію анти-CRISPR. У такому стані клітина не може чинити опір проникненню інших мобільних генетичних елементів і, отже, горизонтальному переносу генів. При довготривалій інактивації CRISPR-Cas бактерія може зовсім втратити гени cas або накопичити мутації, які роблять їх нефункціональними.

## ПРАКТИЧНА ЧАСТИНА

Практичне заняття 1. Виділення вірусів ціанобактерій з оточуючого середовища.

Завдання: отримати концентрований препарат ціанофагу.

### Хід роботи

А) Концентрація ціанофігів методом диференційного центрифугування:

1. Відібрати зразки води, які містять ціанофаги об'ємом 500мл.
2. Профільтрувати зразок через 0,2 мкм бактеріальний фільтр.
3. Зконцентрувати вірус за допомогою високошвидкісного центрифугування в режимі 24000 об/хв протягом двох годин.
4. Видалити надосадову рідину.
5. Ресуспендувати осад у середовищі для культивування ціанобактерій BG11 об'ємом 1-2 мл.
6. Провести низькошвидкісне центрифугування ресуспендованого осаду в режимі 4000 об/хв протягом 20 хвилин.
7. Відібрати надосадову рідину, яка містить концентрований вірус.
8. Зберігати зразки при температурі + 4<sup>0</sup>С.

Б) Метод концентрації ціанофагів з використанням ПЕГ та NaCl

1. Відібрати зразки води, які містять ціанофаги об'ємом 500мл.
2. Профільтрувати зразок через 0,2 мкм бактеріальний фільтр.
3. Додати NaCl до 1М концентрації та ПЕГ 6000 до 10% (мас/об), інкубувати 2 год при +4<sup>0</sup>С.
4. Центрифугувати препарат при 6000 об/хв протягом 30 хв.
5. Відібрати осад та ресуспендувати в 1мл буферу для ціанофагів (5 мМ MgCl, 5 мМ CaCl, 10 мМ NaCl, 10 мМ HEPES, pH 7,0).
6. Видалити залишки ПЕГ 6000 за допомогою діалізу проти буферу для ціанофагів (5 мМ MgCl, 5 мМ CaCl, 10 мМ NaCl, 10 мМ HEPES, pH 7,0).
7. Зберігати зразки при температурі + 4<sup>0</sup>С.

## Практичне заняття 2. Вивчення морфології вірусів ціанобактерій.

Завдання: визначити морфологію та розмір ціанофага

### Хід роботи

1. Приготувати 0,2% розчин формвару на хлороформі. У розчин формвару занурити предметне скло на 10-20с, а потім вийняти та висушити.
2. Зняти формварову плівку на воду та покласти на неї сіточки для електронної мікроскопії. Покласти сіточки зплівкою у чашку Петрі і висушити.
3. На приготовлену сіточку нанести препарат ціанофагів на 2 хв.
4. Перекласти сіточку у розчин 2% водний ураніл-ацетату на 2 хв.
5. Покласти до контейнера для зберігання.
6. Переглянути за допомогою трасмісійного електронного мікроскопу у діапазоні збільшень 1:20000-1:30000.
7. Описати морфологію та визначити розмір ціанофага..

## Практичне заняття 3. Вивчення біологічних властивостей ціанофагу.

Завдання. Визначити титр ціанофагу методом подвійних агарових шарів.

### План

1. 2% агаризоване середовище BG11 залити в чашки Петрі по 15-20 мл та висушити.
2. Препарат ціанофага розтитрувати методом 10-кратних розведень. У 7 стерильних пробірок внести по 4,5 мл середовища BG11 та приготувати послідовні десятикратні розведення ціанофагу від  $10^{-1}$  до  $10^{-7}$ . У першу пробірку внести 0,5 мл ціанофагу. Замінивши піпетку новою, ретельно перемішати вміст 1-ї пробірки і перенести 0,5 мл в 2-гу пробірку і т.д. Кожен раз необхідно брати нові піпетки (або носики). Перемішавши вміст 7-ї пробірки, 0,5 мл розведення із неї вилити у дезрозчин. 8 пробірку позначити КК (контроль культури), а 9 - КФ (контроль фагу-внести 0,5 мл ціанофагу).

3. У всі пробірки досліду, крім пробірок №9 внести по 0,5 мл суспензії тест-культури ціанобактерії. Внесення культури проводять однією піпеткою з пробірки № 8 до №1. Інкубація 1 год при кімнатній температурі.
4. У пробірки внести 2,5 мл розплавленого 0,5% агаризованого середовища BG11 та охолодити до 45<sup>0</sup>С та додати вміст пробірок приготовлений в п.2 та п.3., ретельно перемішати та вилити в чашки Петрі на нижній агар.
5. Після того як верхній шар застиг, чашки Петрі ставлять на інкубацію при 25<sup>0</sup>С і спостерігають протягом 3-10 діб.
6. Закількістю негативних колоній у перерахунку на розведення та об'єм визначають титр ціанофагу.

Практичне заняття 4. Вивчення основних параметрів інфекційного процесу вірусів мікоплазм та ціанобактерій.

Завдання: побудувати криві одиночного циклу розвитку вірусів мікоплазм та ціанобактерій.

#### План

1. Використовуючи літературні данні, описати експеримент із одиночного циклу розвитку вірусу архей, із зазначенням значення множинності інфекції, тривалості латентного періоду, періоду лізису та виходу вірусу і за цими даними будувати криву життєвого циклу вірусу архей.
2. На основі літературних даних описати експеримент із одиночного циклу розвитку вірусу мікоплазм, із зазначенням значення множинності інфекції, тривалості латентного періоду, періоду лізису та виходу вірусу і за цими даними будувати криву життєвого циклу вірусу.
3. Використовуючи літературні данні, описати експеримент із одиночного циклу розвитку ціанофагу, із зазначенням значення множинності інфекції, тривалості латентного періоду, періоду лізису та виходу фага і за цими даними будувати криву життєвого циклу ціанофагу.

4. Порівняти криві одиночного циклу розвитку вірусу архей, мікоплазм та ціанофагу.

Практичне заняття 5. Молекулярні методи дослідження вірусів ціанобактерій

Завдання: виділити ДНК ціанофага та провести його ідентифікацію з використанням ПЛР.

#### Хід роботи

##### А) Виділення нуклеїнової кислоти за допомогою СТАВ методу

1. 200 мкл вірусного препарату вносять у мікропробірку, додають 1 мл СТАВ-буферу, ретельно перемішують та інкубують в термостаті при 65°C 1 год. Кожні 10 хв обережно струшують.
2. Після інкубації центрифугують 2 хв при 13000 об/хв.
3. До зразку додають хлороформ у співвідношенні 1:1.
4. Зразок, ретельно перемішують протягом 5 хв.
5. Центрифугують 2 хв при 13000 об/хв.
6. Супернатант осаджують ізопропіловим спиртом 1:1,5 (зразок:спирт), витримують при -20 С 10-15 хв;
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 міститься ДНК висушують та розчиняють у 50-100мкл ТЕ-буферу.
11. 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.

##### Б) Проведення ПЛР з вірусоспецифічними праймерами для ідентифікації ціанофага.

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

У залежності від праймерів змінюється температура їх відпалу.

Для детекції рекомендується використовувати праймери, які дозволять визначати представників певної родини, тобто родиноспецифічні праймери, наприклад праймери до основного капсидного білку прісноводних ціанофагів родини *Myoviridae*, при цьому ампліфікується продукт розміром 350пн

AN15 MCPF5: GTTCCTGGCACACCTGAAGCGT

AN15 MCPR5: CTTACCATCGCTTGTGTCTGGCATC

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. Скласти перелік вірусів, які інфікують представників *Euryarchaeota*.
2. Скласти перелік вірусів, які інфікують представників *Crenarchaeota*.
3. Описати експеримент із поодинокого циклу розвитку вірусів мікоплазм, із зазначенням значення множинності інфекції, виходу фага, тривалості латентного періоду та життєвого циклу.
4. Скласти перелік видів ціанобактерій, які є хазяями прісноводних ціанофагів.
5. Описати криву одиночного циклу розвитку ціанофага.
6. Зобразити культури ціанобактерій наступних родів: *Synechococcus*, *Nostoc*, *Microcystis*, *Anabaena*, *Lyngbya*, *Plantotrix*, *Plectonema*.
7. Ознайомитись з спектрофотометричним методом визначення концентрації ціанобактерій.
8. Розшифрувати назву обраного ціанофага згідно сучасної номенклатури.
9. Ознайомитись з методами культивування архей в лабораторних умовах.
10. Описати криву одиночного циклу розвитку вірусу архей.
11. Ознайомитись з методом визначення концентрації вірусів архей.
12. Охарактеризувати хазяїв вірусів архей.
13. Охарактеризувати хазяїв вірусів мікоплазм та ціанобактерій.
14. Охарактеризувати молекулярні методи детекції вірусів прокариотів.
15. Порівняти між собою методи вивчення вірусів архей та мікоплазм
16. Порівняти між собою діагностичні молекулярні маркери вивчення вірусів архей, мікоплазм та ціанобактерій.
17. Порівняти між собою клітинну стінку бактерій та архей.
18. Порівняти літичний та лізогенний цикли розвитку вірусів прокариотів.
19. Порівняння різних методів визначення титрів вірусів прокариотів
20. Джерела виділення архей, особливості вірусів архей.
21. Особливість синтетичних процесів у архей
22. Характеристика мікоплазм патогенних для людини та тварин

23. Антибактеріальні препарати на основі вірусів прокаріотів.
24. Застосування вірусів прокаріотів у біотехнології та медицині
25. Порівняння механізмів стійкості до вірусів у прокаріотів та рослин.
26. Практичне значення систем CRISPR/Cas та RM.

## КОНТРОЛЬНІ ЗАПИТАННЯ ДО МАТЕРІАЛУ СПЕЦКУРСУ

1. Гіпотези про природу та походження вірусів архей, мікоплазм та ціанобактерій
2. Систематика вірусів архей, мікоплазм та ціанобактерій
3. Особливості будови вірусів архей, мікоплазм та ціанобактерій
4. Нуклеїнові кислоти вірусів архей, мікоплазм та ціанобактерій, їх типи, склад, особливості структурної організації.
5. Елементи структури вірусів архей, мікоплазм та ціанобактерій
6. Характеристика етапів збірки вібріонів на окремих представниках вірусів прокаріотів.
7. Морфотипування вірусів архей, мікоплазм та ціанобактерій: причини появи, існуючі морфотипи.
8. Особливості взаємодії вірусів з бактеріальною клітиною у залежності від структури клітинної стінки.
9. Механізм адсорбції. Фагоспецифічні рецептори клітинної оболонки прокаріотів.
10. Вивчення основних параметрів інфекційного циклу вірусів прокаріотів.
11. Різноманіття типів нуклеїнових кислот у вірусів архей, мікоплазм та ціанобактерій.
12. Охарактеризувати причину низької частоти літичної інфекції у ціанофагів.
13. Порівняти літичний життєвий цикл вірусу прокаріотів та життєвий цикл вірусу з псевдолізогенією.
14. Причини резистентності мікоплазм до вірусів.
15. Описати життєвий цикл *Acholeplasma phage L2*.
16. Вказати морфологію фагу LPP-1A прісноводної ціанобактерії *Plectonema boryanum*.
17. Вказати діагностичні маркери для ціанофагів.
18. Дати характеристику родині *Bicaudaviridae*.
19. Охарактеризувати особливості взаємодії морських ціанофагів з господарем.

20. Вказати шляхи резистентності *Synechococcus* до фагів.
21. Дати характеристику родині *Ampullaviridae*.
22. Охарактеризувати особливості життєвого циклу ціанофагів.
23. Наведіть загальну характеристику архей, мікоплазм та ціанобактерій.
24. Механізми виходу вірусу з архей.
25. Практичне значення лізогенної конверсії.
26. Поняття фагостійкості та імунності бактерій до вірусів.
27. Особливості взаємодії вірусів з архей, мікоплазм та ціанобактерій.
28. Особливості внутрішньоклітинного розвитку вірусів прокаріот.
29. Особливості реплікації ДНК-вмісних вірусів прокаріот.
30. Методи вивчення інфекційної активності вірусів архей, мікоплазм та ціанобактерій.
31. Поширення вірусів архей, мікоплазм та ціанобактерій в природі.
32. Практичне значення вірусів архей, мікоплазм та ціанобактерій.
33. Механізми стійкості прокаріот до вірусів.
34. Анти-CRISPR білки.
35. Розподіл систем CRISPR-Cas в археях та бактеріях.

## ПРИКЛАДИ ТЕСТОВИХ ПИТАНЬ

1. Особливість нуклеїнових кислот вірусів прокаріотів полягає в :
  - а) відсутності кільцевих форм ДНК
  - б) наявності одноланцюгових розривів
  - в) наявності аномальних азотистих основ
  - г) відсутності третинної структури
  - д) наявності кеп-структур
2. Вказати нелітичний вірус прокаріотів:
  - а) фаг фХ174
  - б) фаг М13
  - в) фаг L 51
  - г) фаг Mu
  - д) фаг MS2
3. *Acholeplasma phage MV-L51* належить до родини:
  - а) *Plasmaviridae*
  - б) *Inoviridae*
  - в) *Microviridae*
4. Вибрати родини вірусів, які інфікують представників *Euryarchaeota*
  - а) *Fuselloviridae*
  - б) *Pleolipoviridae*
  - в) *Myoviridae*
  - г) *Guttaviridae*
5. Серед вірусів архей переважають віруси з :
  - а) літичним циклом розвитку
  - б) лізогенним циклом розвитку
  - в) псевдолізогенним циклом розвитку
6. Геном фагів *Mollicutes* представлений:
  - а) тільки 2-х ланцюговою ДНК
  - б) тільки 1-но ланцюговою ДНК або РНК

в) тільки ДНК

7. *Spiroplasma phage 4* належить до родини:

а) *Plasmaviridae*

б) *Inoviridae*

в) *Microviridae*

8. VAP структури формуються при інфікуванні архей:

а) *Fuselloviridae*

б) *Rudiviridae*

в) *Myoviridae*

г) *Guttaviridae*

9. Вказати представники яких родин вірусів інфікують рід *Sulfolobus*:

а) *Globuloviridae*

б) *Rudiviridae*

в) *Myoviridae*

г) *Guttaviridae*

10. Кінцева надлишковість геному вірусів прокариот характеризується

а) видовження хвостового відростку під впливом УФ

б) наявністю повторних генів на кінцях ДНК

в) утворенням конкатемерів.

Г) утворенням профагу

11. Особливість ДНК архей термофілів полягає в:

а) ДНК є негативно суперспіралізованою

б) ДНК є позитивно суперспіралізованою

в) ДНК містить аномальні азотисті основи

12. Вибрати родини вірусів, які інфікують представників *Euryarchaeota*

а) *Fuselloviridae*

б) *Pleolipoviridae*

в) *Myoviridae*

г) *Guttaviridae*

## ПЕРЕРЕЛІК РЕКОМЕНДОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Поліщук В.П., Будзанівська І. Г., Шевченко Т.П. та ін. Вірусологія. Навчальний посібник для лабораторних занять.- К.:ТОВ "Центр поліграфії "КОМПРИНТ", 2017р.-262с
2. Шевченко Т.П., Будзанівська І.Г.Поліщук В.П.Віруси мікроорганізмів. Курс лекцій. –К: ЦОП «Глобус».-2013.-148с.
3. Acheson N.H. Fundamentals of molecular virology. 2nd Edition / Nicholas H. Acheson. - New York: John Wiley & Sons.- 2007.- 432p
4. Bacteriophage: Genetics and Molecular Biology. Eds.: McGrath S., van Sinderen D. - Caister Academic Press, 2007. -344 P.
5. Bacteriophages: biology and applications / edited by Elizabeth Kutter, Alexander Sulakvelidze. – Boca Raton: CRC PRESS, 2005. – 528 p.
6. Baquero, D. P., Liu, Y., Wang, F., Egelman, E. H., Prangishvili, D., & Krupovic, M. (2020). Structure and assembly of archaeal viruses. *Advances in Virus Research*. doi:10.1016/bs.aivir.2020.09.004
7. Calendar R.L. The Bacteriophages.-Oxford University press.-2006.-757 pp.
8. Cann A.J. Principles of molecular virology / A.J. Cann. – Burlington: Elsevier academic Press, 2005. – 316 с.
9. Carter J. Virology: principles and applications / J. Carter, V. Saunders. – Chichester:John Wiley & Sons Ltd, 2007. – 382 p.
10. Encyclopedy of Virology /Ed. by A. Granoff, R. Webster/ - Academic Press, San Diego, 2000.– 3252 p.
11. Millard AD. Isolation of cyanophages from aquatic environments. *Methods Mol Biol*. 2009;501:33-42. doi:10.1007/978-1-60327-164-6\_4
12. Miller E.S., Kutter E., Mosig G. et al. Bacteriophage T4 genome // *Microbiology and molecular biology reviews*.-2003.- P.86-156.
13. Turner D, Kropinski AM, Adriaenssens EM. A Roadmap for Genome-Based Phage Taxonomy. *Viruses*. 2021 Mar 18;13(3):506. doi: 10.3390/v13030506. PMID: 33803862; PMCID: PMC8003253.
14. Virus taxonomy. Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses / [eds. Andrew King. et al.]. – Wien: Springer-Verlag, 2012. – 1327 p.