



ӘЛ-ФАРАБИ АТЫНДАҒЫ ҚАЗАҚ ҰЛТТЫҚ УНИВЕРСИТЕТІ  
БИОЛОГИЯ ЖӘНЕ БИОТЕХНОЛОГИЯ ФАКУЛЬТЕТІ  
МОЛЕКУЛАЛЫҚ БИОЛОГИЯ ЖӘНЕ ГЕНЕТИКА КАФЕДРАСЫ

## ДӘРІС 7. БАКУЛАВИРУС-НАСЕКОМДАР ЭКСПРЕССИЯЛАУ ЖҮЙЕСІ

Лектор: PhD, қауымдастырылған  
профессор Тайпақова С.М.

# **Жоспар:**

**Бакуловирустар**

**Бакуловирустардың вириондары**

**Бакуловирустың тіршілік циклі**

**Бакулавирус-насеком экспрессиялау жүйесі**

**Vac-to Vac жүйе**

# БАКУЛАВИРУС-НАСЕКОМДАР ЭКСПРЕССИЯЛАУ ЖҮЙЕСІ

- Биакулавирустар тек омыртқазыздарды, сонымен қатар насекомдарды, инфекциялайды
- Инфекциялау барысында олардың екі формасы түзіледі
- Бір формасы, вириондар. Вириондар инфекцияланған қожайын клеткадан бөлініп, көрші клеткаларды инфекциялайды
- Екінші формасы, белоктық матрицамен қоршалған көптеген вириондардан тұрады. Белокты матрица полиэдрон деп аталады.
- Полиэдрон, полиэдрин деген белоктардан құралған.
- Клеткаларда, полиэдрин синтезі инфекцияланғаннан кейін 36-48 сағаттан кейін синтезде бастайды. Одан әрі оның синтезі 4-5 тәулікке созылады.
- Содан соң, қожайын клеткаларыв лизиске ұшырап, қожайын организм өледі. Белоктық матрицамен қапталған вириондар сыртқы ортаға шығады.
- Осы полиэронмен қапталған вириондар омыртқасыздардың организіміне енсе, олар жоғарыда келтірілген инфекциялық процестерді (Тіршілік циклі) қайтадан бастайды.

**Бакуловирустар** ([лат. \*Baculoviridae\*](#)) — бұл *Baculoviridae* тұқымдасына біріктірілген, негізінен *Lepidoptera*, *Diptera* және *Hymenoptera* отрядтарына жататын жәндіктер үшін патогенді, таяқша тәрізді вирустар тобы. Адамдар мен омыртқалылар үшін патогенді емес. Бакуловирустар пішіні бациллярлы, көлемі 250-400×40-70 нм, сыртқы және ішкі мембранасы бар. Геномы - екі тізбекті ДНҚ, шыбын-шіркейлердің торшаларында кристалл тәрізді (6 қырлы полиэдрлер) белок қоспалары болады. Бұл вирустардың негізгі өкілі - тұт ағашы жібек құртының полэдроз қоздырушысы. Бакуловирустар ауру тасымалдайтын шыбын-шіркейлермен күресуде қолданылады.



<a href="#">Вирус таптастыруы</a>	
Тобы:	Group I ( <a href="#">dsDNA</a> )
Тұқымдасы:	<b><i>Baculoviridae</i></b>
Тектері	
<a href="#">Alphabaculovirus</a> <a href="#">Betabaculovirus</a> <a href="#">Deltabaculovirus</a> <a href="#">Gammabaculovirus</a>	

**Бакуловирустардың вириондары** - таяқша тәрізді нуклеокапсидтер. Липопротеинді мембранамен қапталған. Геном мөлшері 160 кб дейінгі екі тізбекті ДНҚ. Бакуловирус тобы кіші топтарға бөлінеді, олардың 2-сі үлкен белокты кристалдарын түзеді, онда олардың вириондары оралады. Бұл кристалдар инклюзия денелері деп аталады.

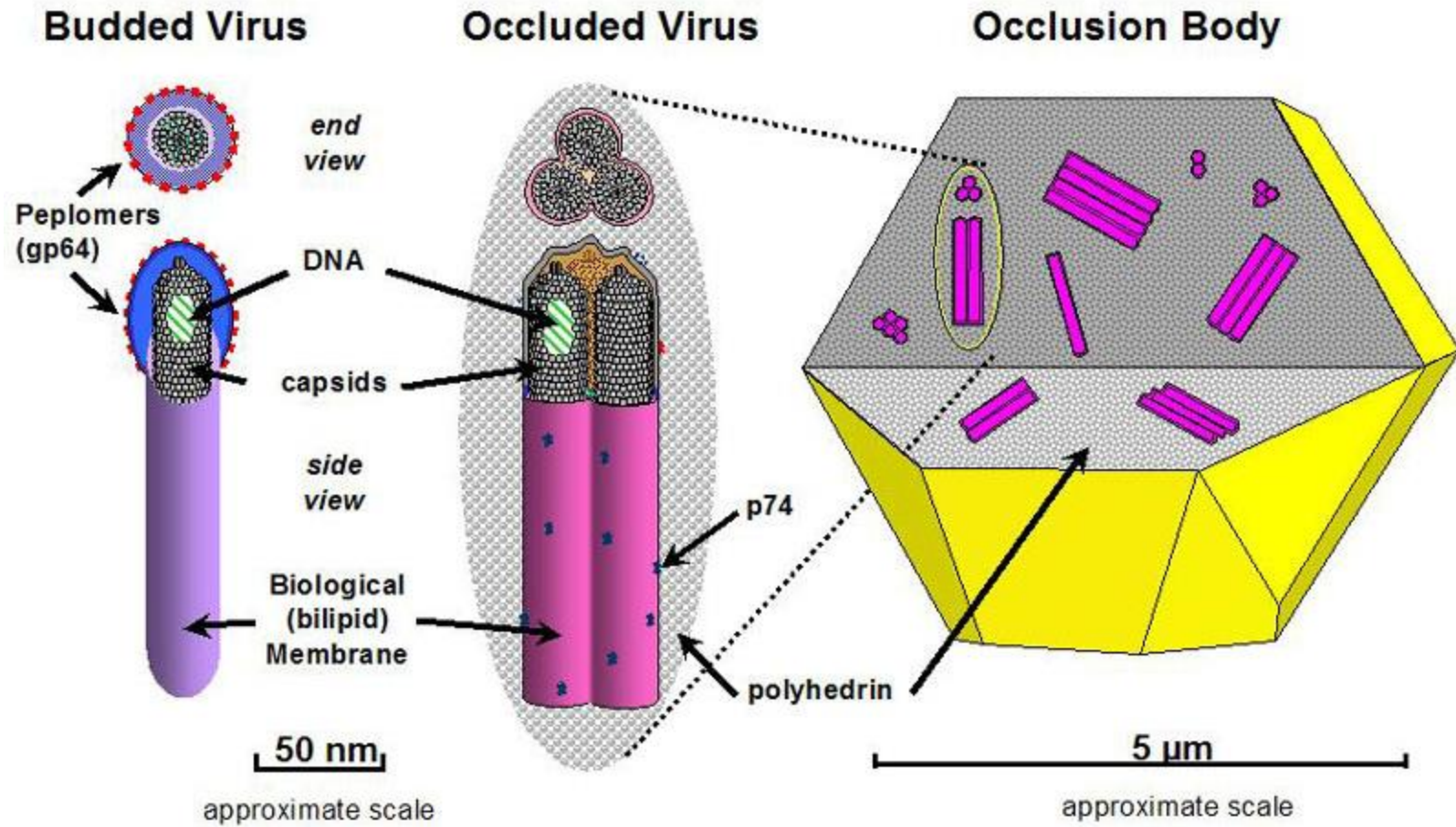
**А кіші тобы** - ядролық полиэдроз вирустары (NPV): олар жасуша ядросында полиэдрондар түзеді. Размери 1-15 мкм

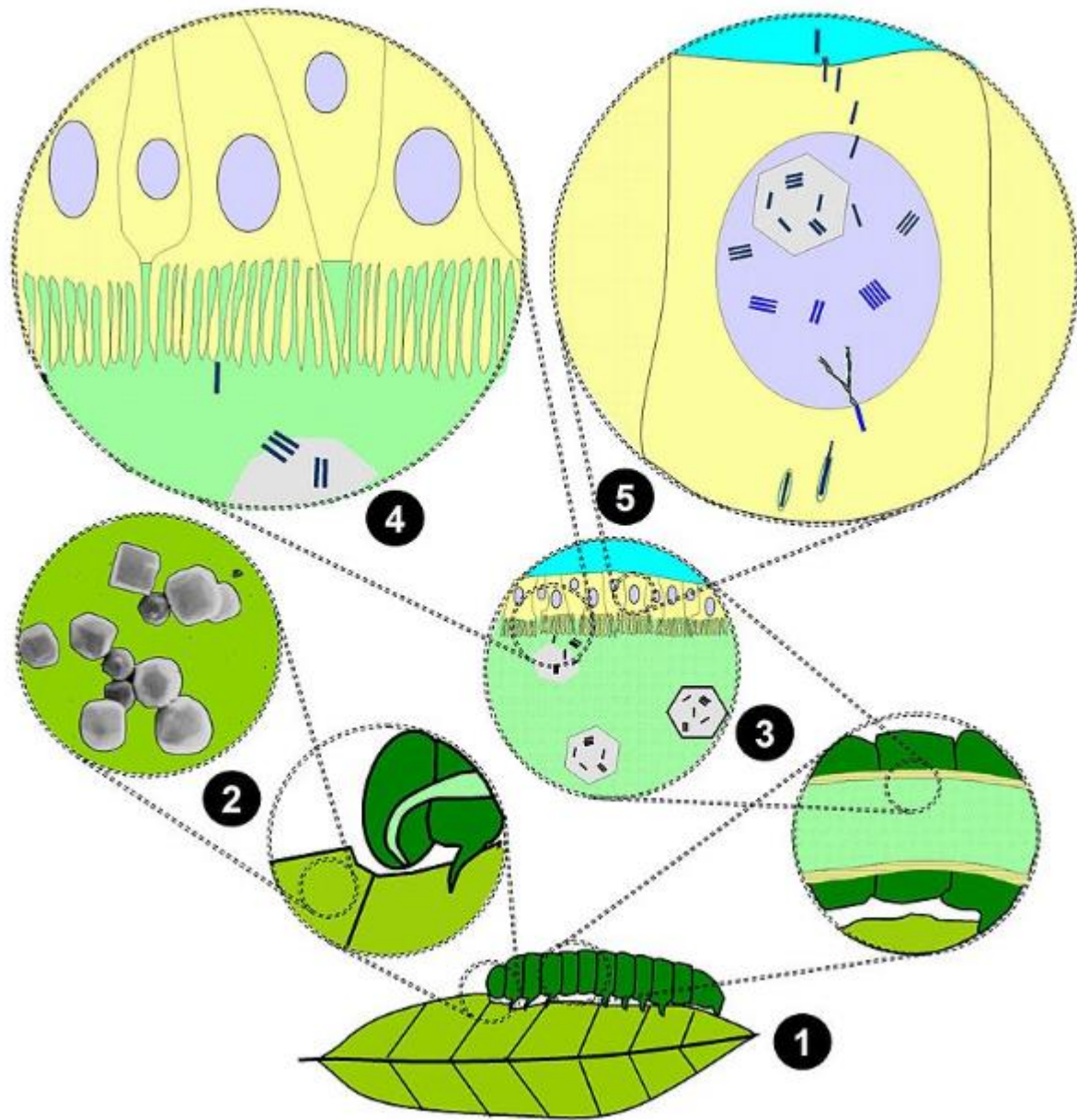
**В кіші тобы** - гранулез вирустары (GV): цитоплазмада сопақ түйіршіктер түріндегі кристалды қосындылар түзіледі. Әр түйіршікте әдетте 1 вирион болады. Гранула размери 0,3-1 мкм

**С кіші тобы** - инклюзия денелерін құрмайды.

# Baculovirus

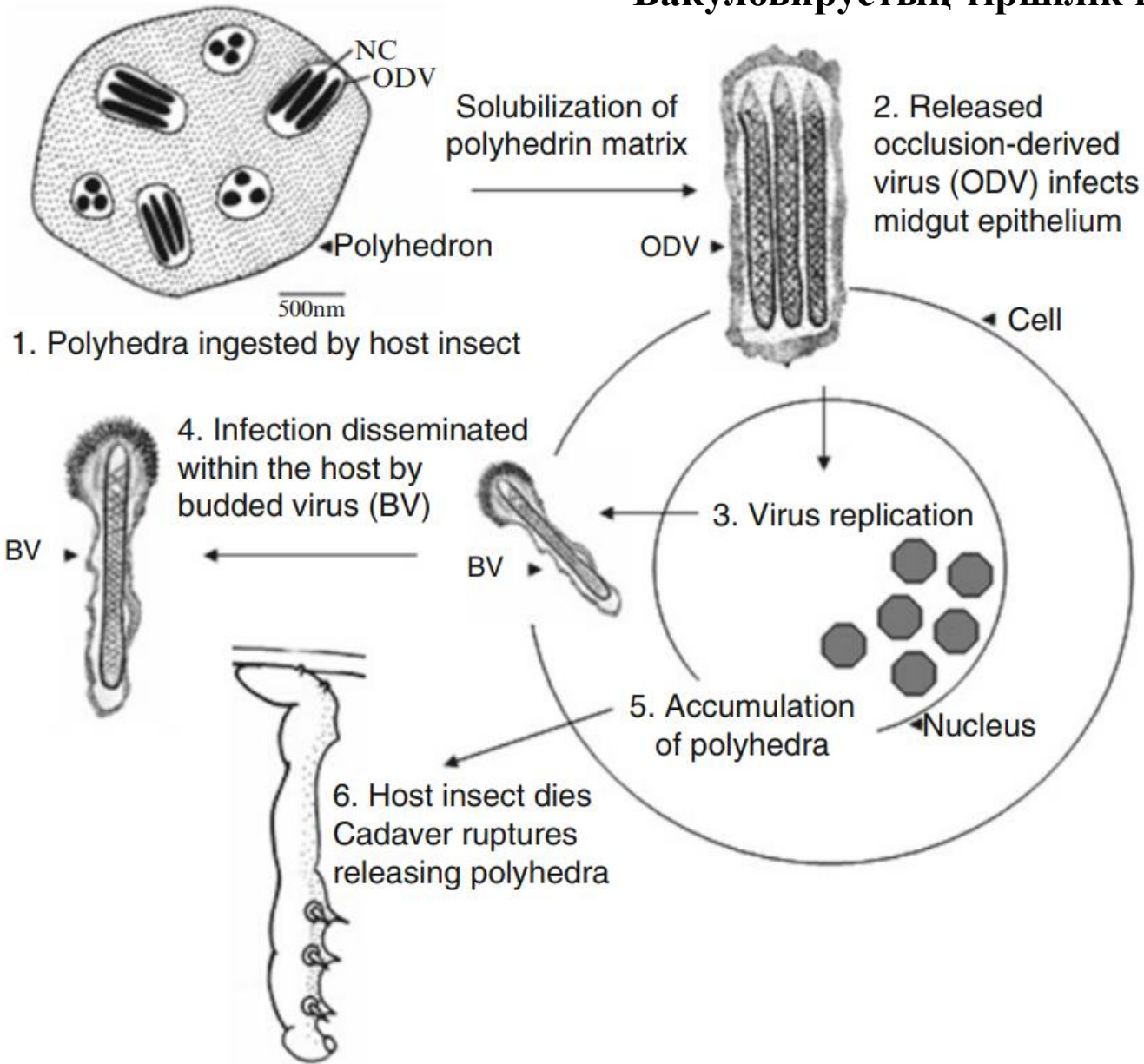
## Multicapsid nucleopolyhedrovirus





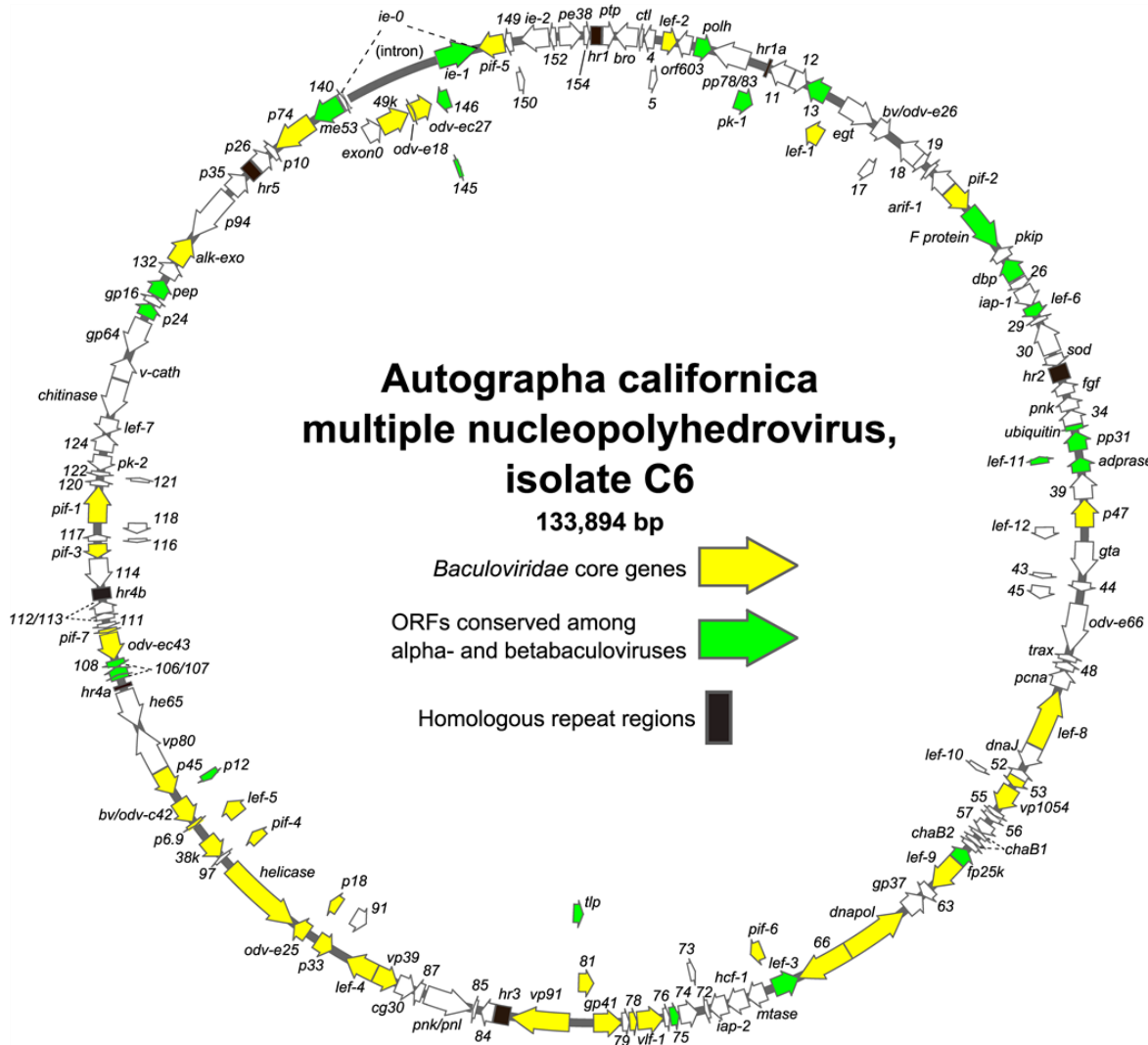
1. Насеком вируспен ластанған жапырақты жейді
2. Насеком полиэдронмен қапталған вириондармен (вирион денешіктері) жанасады
3. Вирион денешіктері асқазанға түседі.
4. Полиэдрон еріп, вириондар ішек клеткаларын инфекциялайды
5. Инфекцияланған клеткаларда вирус репликацияланады (көбейеді)

## Бакуловирустың тіршілік циклінің диаграммасы.



Өсімдіктерді жұқтыратын вирус тамақпен бірге жұлдыз құрт ішектеріне енеді, содан кейін эндоцитоз арқылы ішек жасушаларына енеді, онда вирустық ДНҚ капсидтен құтылып, жасуша ядросына енеді, онда вирустық ДНҚ репликация мен транскрипция және нуклеокапсидтің түзілуі жүреді. Вирустың жасушадан тыс аралық түрінің бөлшектері - жеке вириондар - зарарланған жасушалардың плазмалық мембранасынан бөлініп шығады. Инфекцияның соңғы кезеңінде вириондар қоршаған ортада тиімді сақталатын полиэдра ақуыздарының құрамына кіреді.





Ең көп қолданылатын ядролық полиэдроздың вирусы — **Autographa californica** (*AcMNPV* *Autographa californica multicapsid nucleopolyhedrovirus*).

Бұл бакуловирус жәндіктердің 30-дан астам түрлерін зақымдайды және көптеген жасушалар қатарында жақсы өседі.

Рекомбинантты AcMNPV-мен жұмыс істеу үшін әдетте қолданылатын жасушалық линиялар *Spodoptera frugiperda* жұлдыз құрттарынан алынады.

Бұл жасушалардағы полиэдрин промоторы өте белсенді және оларды жабайы типтегі бакуловирус жұқтырған кезде көп мөлшерде ақуыз синтезделеді.

Экспрессияның реттелуі каскадты түрде жүзеге асырылады:

өте ерте альфа-гендер қожайын жасушаның факторларымен белсендіріледі. Альфа-ген өнімдері артта қалған бета-гендер мен кейбір кеш гамма-гендерді белсендіреді.

Кеш гендердің экспрессиясы вирустық ДНҚ синтезімен байланысты.

Өте кеш сигма гендері инклюзия денелерінің қалыптасуына ықпал етеді және альфа, бета және гамма гендерінің белсенділігі репрессияланған кезде көрінеді.

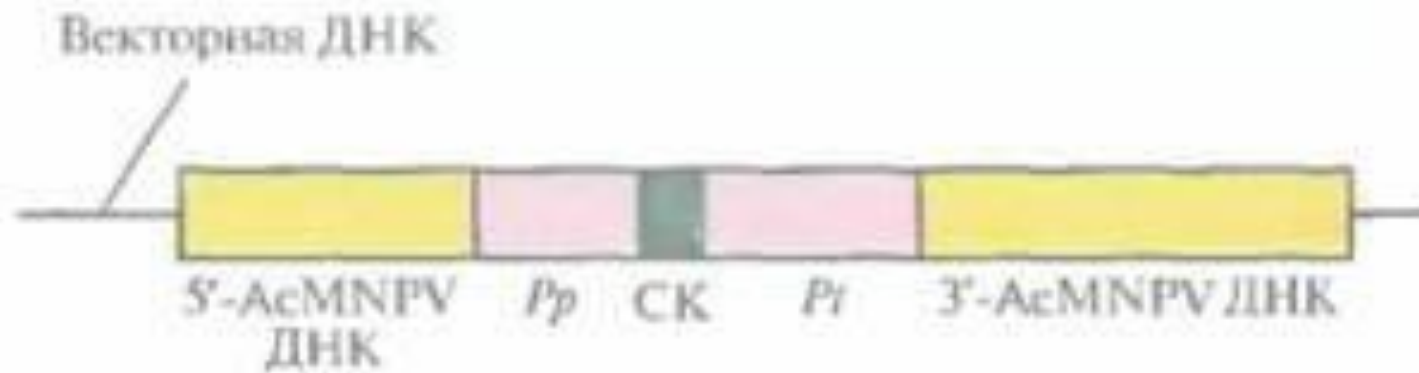
Өте кеш сигма гендері: полиэдрин гені және мол салмағы 10кДА құрайтын р10 белогын кодтайтын ген

P10 белогы полиэдр сыртынан тығыз полисахаридтік мембрананың түзілуін қамтамасыз етеді

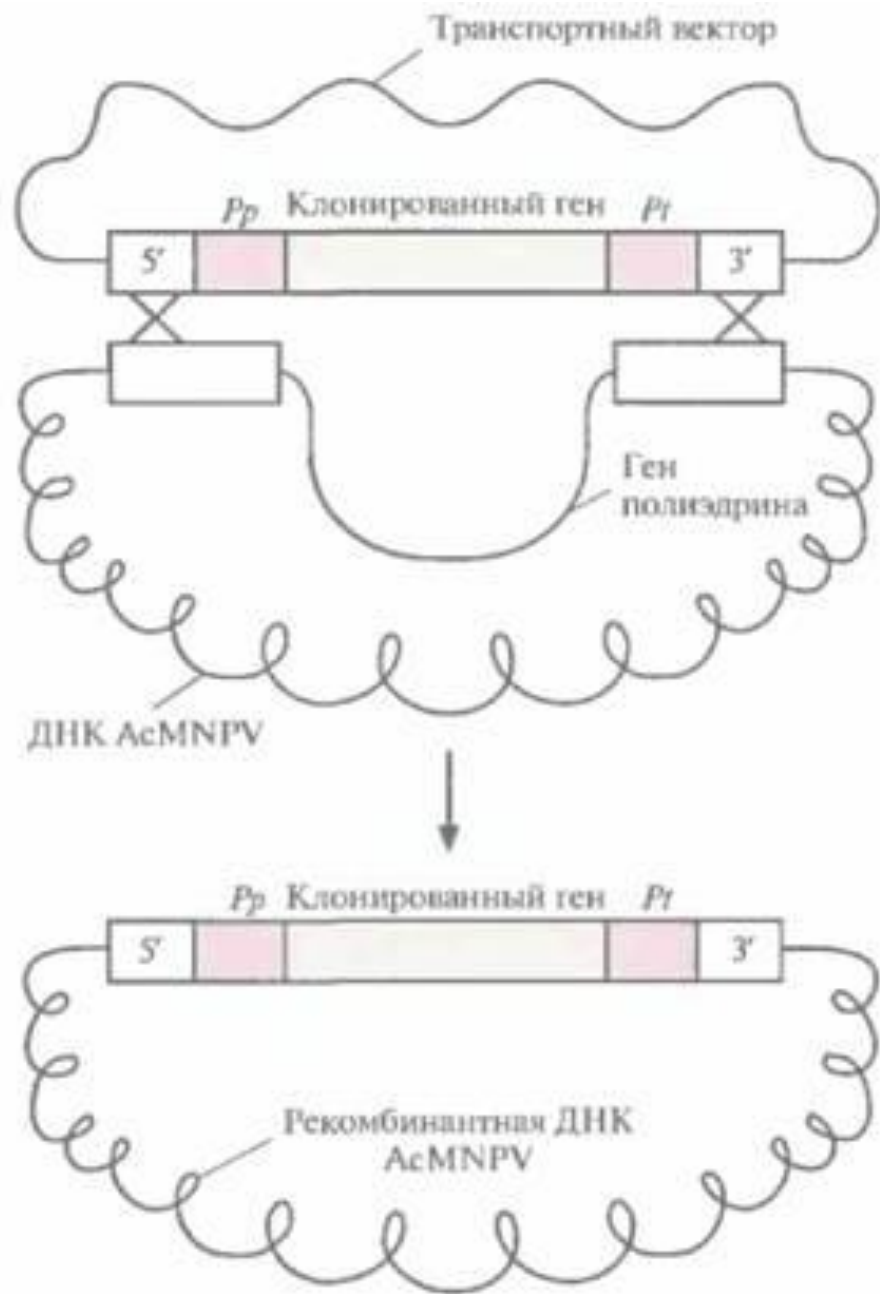
## БАКУЛАВИРУС-НАСЕКОМ ЭКСПРЕССИЯЛАУ ЖҮЙЕСІНІҢ АРТЫҚШЫЛЫҚТАРЫ

- Насеком мен сүтқоректілерде, белоктардың посттрансляциялық модификация жүйелері ұқсас
- Геннің экспрессиялану дәрежесі жоғары. Полиэдрин генінің промоторы конститутивті және күшті.
- Полиэдриннің генін, Бізге қажет генге ауыстыру , вирустың даму цикліне теріс әсер етпейді. Полиэдриннің промоторы, көп мөлшерде рекомбинантты белокты алуға мүмкіндік береді

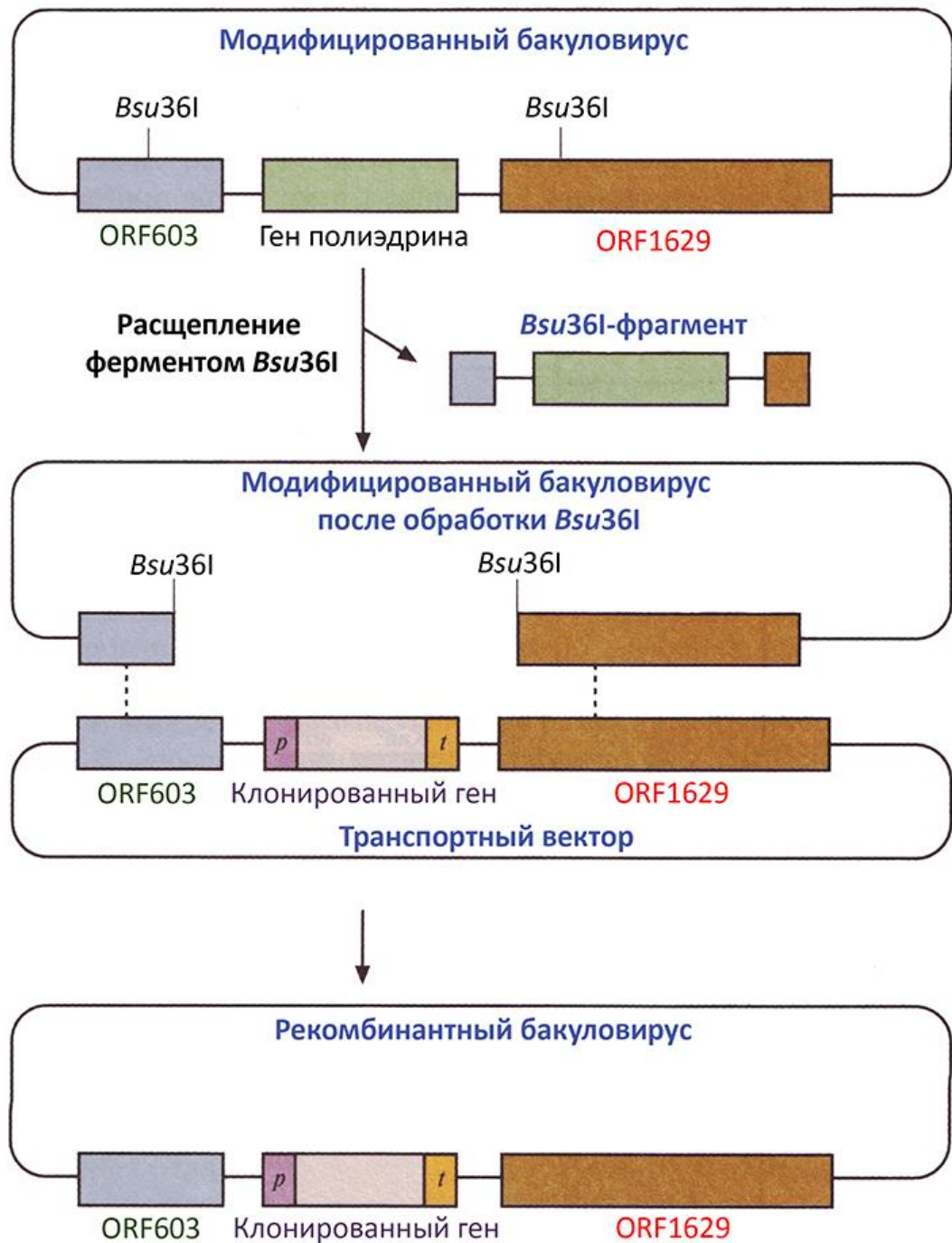
## Бакуловирустың экспрессиясының векторлық жүйесі



AcMNPV рекомбинантты бакуловирусын құрудағы алғашқы қадам - тасымалдау векторын құру. Тасымалдау векторы AcMNPV ДНК фрагментін қамтитын *E. coli* плазмидасының туындысы оған мыналар кіреді: 1) промотор аймағы және оның алдында орналасқан AcMNPV ДНК тізбегі, бұл AcMNPV-мен гомологты рекомбинацияға қажет. ; 2) клондау алаңы; 3) полиэдрин генінің аяқталу-полиаденилдену орны және оған жақын орналасқан AcMNPV ДНК тізбегі - AcMNPV-мен гомологиялық рекомбинацияны қамтамасыз ететін екінші аймақ . Бұл фрагменттен полиэдрин генін кодтау реттілігі жойылды. Промотор мен полиэдрин генін тоқтату сигналы арасында қызығушылық гені енгізіліп, құрылым *E. coli*-ге енгізіледі.

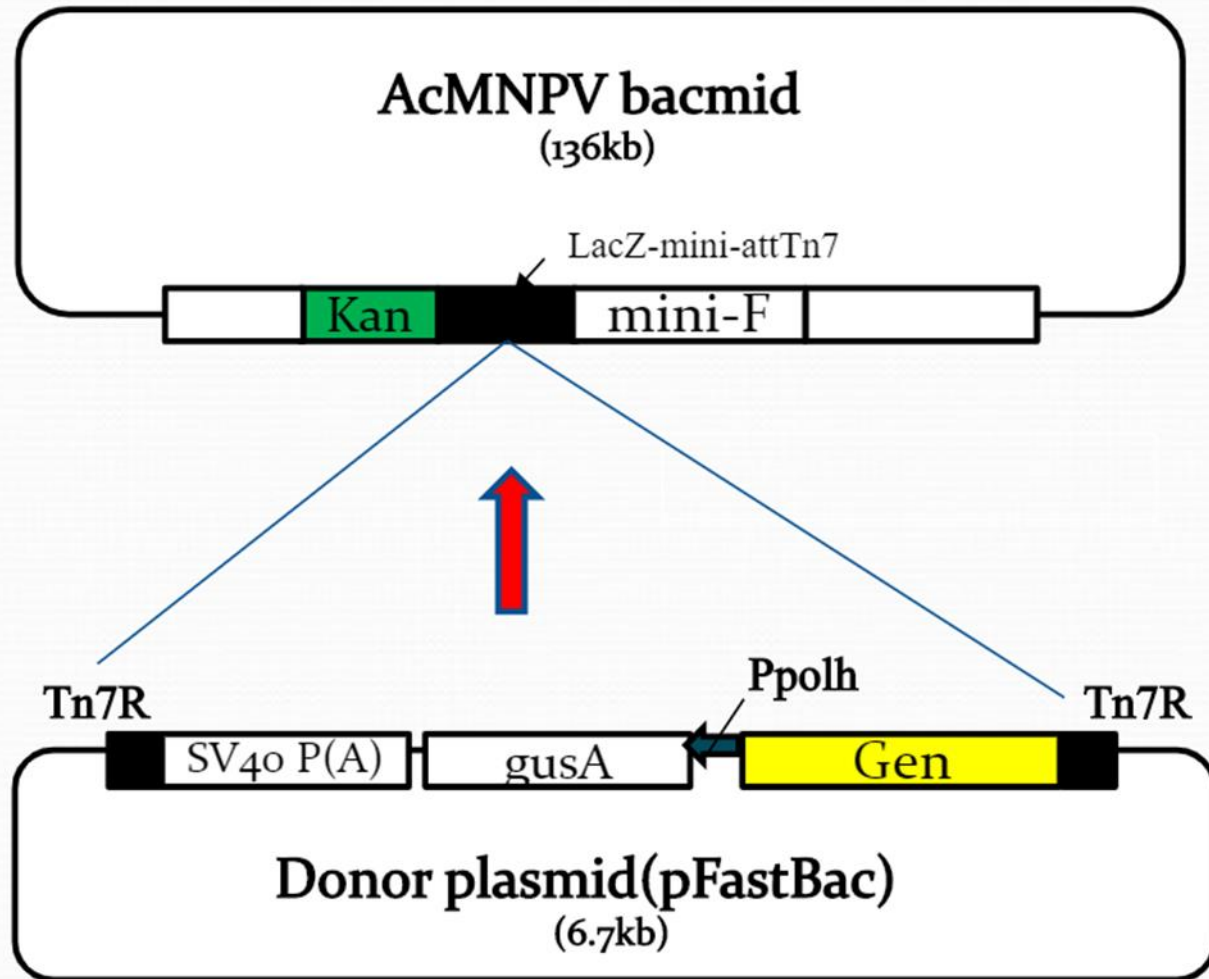


AcMNPV ДНК-мен трансфекцияланған жәндіктер жасушаларының культурасы клондалған генді алып жүретін тасымалдау векторымен трансфекцияланады. Екі рет трансфекцияланған жасушаларда қосарланған айқасу орын алады, нәтижесінде полиэдрин генін алмастыра отырып, AcMNPV ДНК-сына клондалған ген, промотормен және полиэдрин генінің транскрипциясын тоқтату сигналымен бірге енгізіледі. Бұл ген жетіспейтін вириондар жасуша лизисінің аймақтарын құрайды, олардан рекомбинантты бакуловирус оқшаулануы мүмкін.



Жәндіктер жасушаларында рекомбинантты бакуловирус өндірісі. Тасымалдау векторындағы экспрессиялық кассета полиэдрин генінің аймағында (атап айтқанда, ORF1629) AcMNPV ДНҚ-на гомологты секциялармен қоршалған. Олар кассетаны вирустық ДНҚ-ға ауыстыру үшін қажет. Вирус геномынан полиэдрин гені және оған іргелес гендердің кейбіреулері *Bsu36I* рестрикциялық ферментінің көмегімен жойылған. Вирустық көбею үшін маңызды ген - ORF1629 генін «қысқарту» ерекше маңызды. Егер осындай ақаулы вирустық ДНҚ мен тасымалдау векторы бір жәндік жасушасына енгізілсе, гомологиялық рекомбинация нәтижесінде, клондалған гені бар кассета және ORF1629 және ORF603 жетіспейтін бөліктері вирустық ДНҚ-ға «ауысады». Тек осындай рекомбинантты бакуловирус толығымен репликациялана алады. Нүктелік сызықтар қосарлы кроссинговерді көрсетеді; *p* және *t* - сәйкесінше полиэдрин генінің промоторы және терминаторы.

# Bacmid -baculovirus shuttle vector



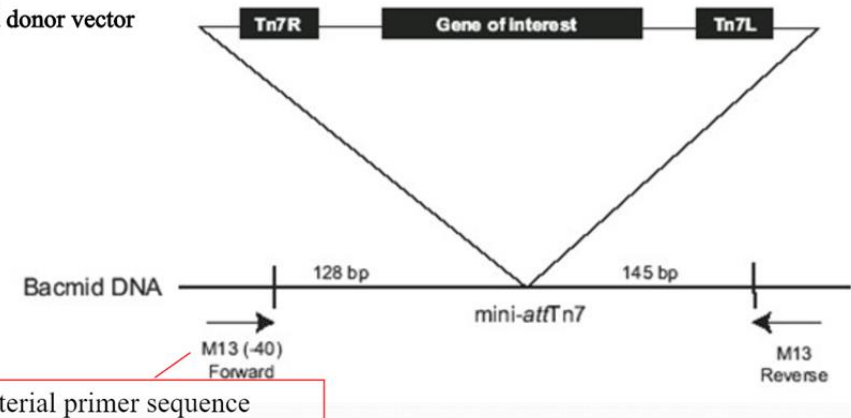
Бакмид

1. мину-F репликон
2. Канамицинге төзімділік гені
3. LacZ-mini-attTn7 (интеграциялану сайты)

Бакмид *E. coli* жасушаларында үлкен, көшірмесі аз плазмида түрінде көбейеді, канамицинге төзімділік пен бактерия синтездеген  $\beta$ -галактозидазаның мутантты түрінің комплементациясын қамтамасыз етеді. Сондықтан IPTG және Xgal бар ортада мұндай бактериялардың колониялары көк түске боялады.

## site-specific transposition

transposed donor vector sequence

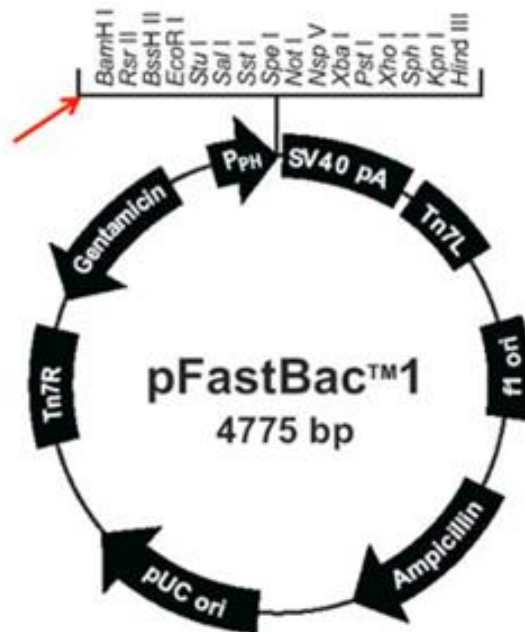


# Гибридті бакуловирус құруға арналған жеңілдетілген Вас-to Вас жүйе

## Пайдаланылатын векторлар

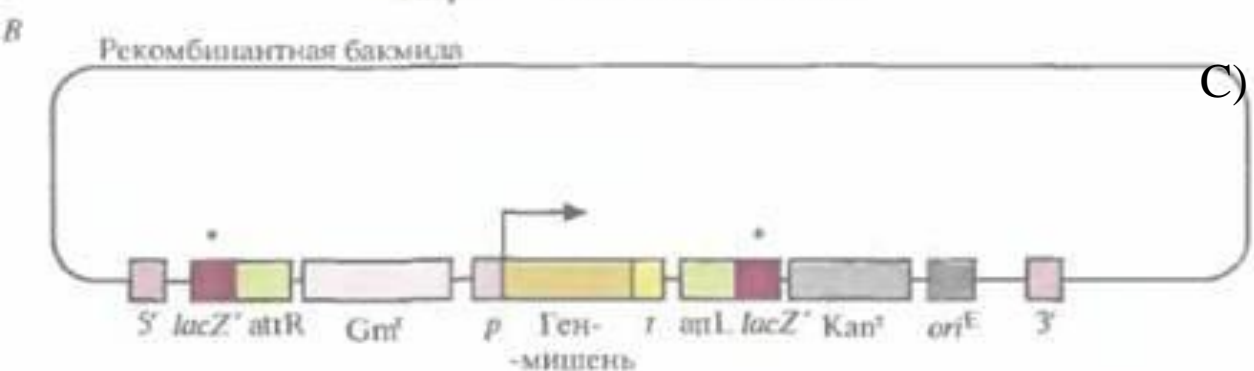
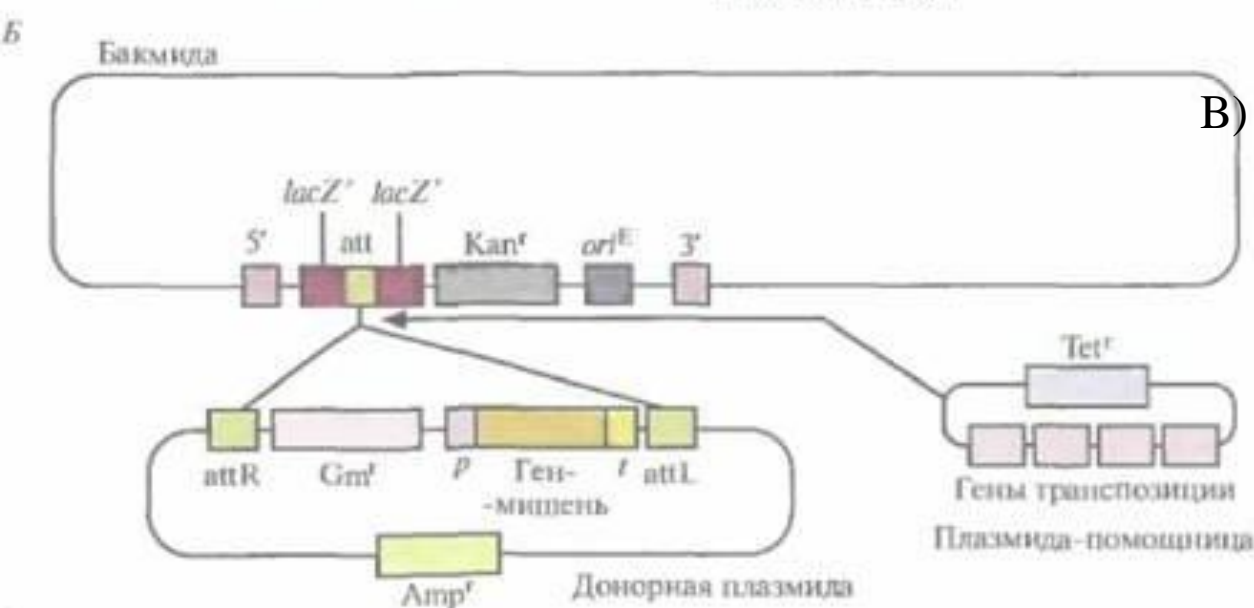
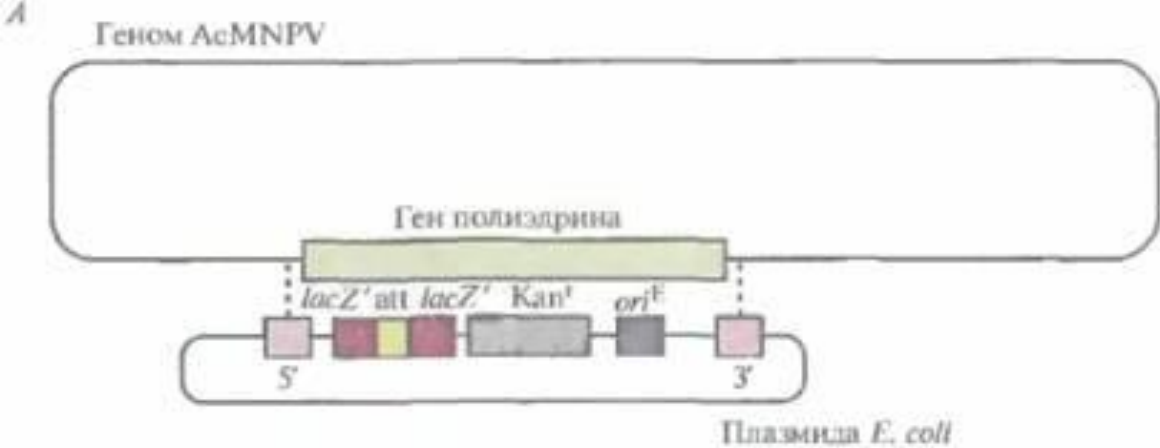
1. Донорлық плазмидтік вектор (қажет ген клондалады)
2. Бакулавирустық Шаттл (челночный) вектор (Бакмид)
3. Көмекші плазмидтік вектор. Құрамында тетрациклинге төзімділік гені, транспозаза ферментінің гені бар.

### pFastBac1- Transfer vector, donor plasmid



- Клондауға арналған сайт (уникальды рестрикциялық эндонуклеаза сайттары)
- SV40 полиадениденуші сай (транскрипцияның тежелу нүктесі)
- Tn7L және Tn7R (транспозиция сайттарының сол және оң иықтары)
- Ампицилинге төзімділік гені
- Гентамицинге төзімділік гені (эукариоттық маркерлік ген)
- Полигидрин генінің промоторы (PPH)
- pUC ori (E. coli ori)





## Рекомбинантты бакмида алу.

А) *E. coli* плазмидасын (пунктир сызықтар) қосарлы кроссинговер көмегімен AcMNPV геномына полиэдрин генін фланкирлеп орналасқан (5' және 3') ДНҚ сегменттері арасына енгізіп, *E. coli* және насеком клеткасында репликациялануға қабілетті шаттл векторын құрайды. Енгізілген плазмидті ДНҚ құрамында канамицинге төзімділік гені (Kan<sup>R</sup>), lacZ тізбегінде клонданған интеграция сайты (att) және *E. coli* репликациясының бастауы (ori<sup>E</sup>) бар.

В) екі интеграциялық учаскелермен (attR және attL) шектелген және гентамицинге төзімділік генін (Gm<sup>r</sup>) және полиэдрин генінің промоторы (p) мен транскрипцияның терминация сайты (t) бақылауындағы мақсатты генді алып жүретін донорлық плазмида фрагменті бакмиданың интеграция сайтына (att) көмекші плазмидада кодталған транспозициялық ақуыздардың көмегімен енгізіледі. Көмекші плазмида мен донор плазмида сәйкесінше тетрациклинге (Tet<sup>r</sup>) және ампициллинге (Amp<sup>r</sup>) төзімділік гендерін алып жүреді.

С) Рекомбинантты бакмиданың құрамында ақаулы lacZ гені бар (\*). Стрелка рекомбинантты бакмидпен жәндіктер жасушаларын трансфекциялаудан кейін клондалған геннің транскрипциясы басталғатын орынды көрсетеді.

*pFastBac donor plasmid*



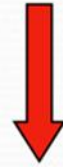
Clone gene of interest

*pFastBac Recombinant*



*Transform into E.coli DH10Bac*

*E.Coli Colonies +Rec Bacmid*



*Grow overnight culture*

*Isolate Rec. Bacmid DNA*

(do not freeze&thaw)



*Transfection into insect cells*

*Rec. Baculovirus*

