



Институт вирусологии им. Д.И.Ивановского РАМН

Обратная генетика: Новые перспективы в биотехнологии и медицине

Забережный Алексей Дмитриевич

доктор биологических наук, заведующий лабораторией
прикладной вирусологии и биотехнологии

Алипер Тарас Иванович

доктор биологических наук, заведующий лабораторией средств
специфической профилактики

V Съезд Общества биотехнологов России
им. Ю.А.Овчинникова, 2-4 декабря 2008 г.
Москва



Институт вирусологии им. Д.И.Ивановского РАМН

Обратная генетика Reverse genetics

Обратная генетика Reverse genetics

“Теперь можно проводить генетические исследования, имея достаточно полную картину генетической структуры вируса, можно фокусироваться на тех или иных генах, целенаправленно вносить мутации в гены для изучения их функций. Этот процесс, названный **обратной генетикой**, теперь будет преобладать в исследованиях, посвященных генетике вирусов”.

Fields Virology,

4-е издание



Обратная генетика Reverse genetics

Обратная генетика Reverse genetics

Обратная генетика - это раздел молекулярной генетики, посвященный *воссозданию, конструированию* функционального генетического материала.



Методы **обратной генетики** предполагают овладение технологией воссоздания генетического материала и получение двух основных компонентов:

- (1) функционального генетического материала
(ген, мини-геном, полный геном)

- (2) экспериментальных условий для его функционирования.



Институт вирусологии им. Д.И.Ивановского РАМН

Методы **обратной** генетики:

Позволяют вносить изменения как в генетический материал, так и в факторы его регуляции.

Представляют собой инструмент для прямой экспериментальной проверки рабочих гипотез о молекулярных механизмах наследственности.

Важны для исследования РНК-содержащих вирусов.

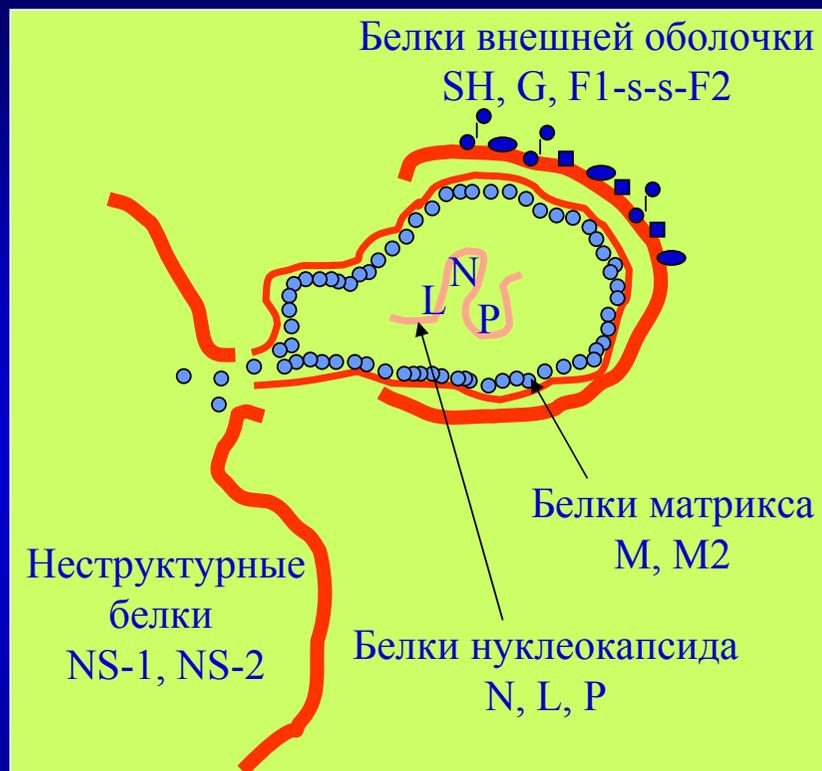
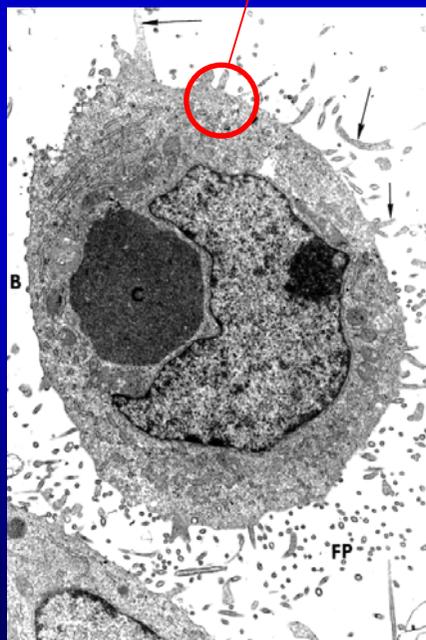


РС- вирус:

Семейство Paramyxoviridae; Род Pneumovirus

Вызывает серьезные заболевания нижнего респираторного тракта, включая бронхит и пневмонию у детей. Инфекция широко распространена в мире. Опасна также для пожилых людей и страдающих иммунодефицитом.

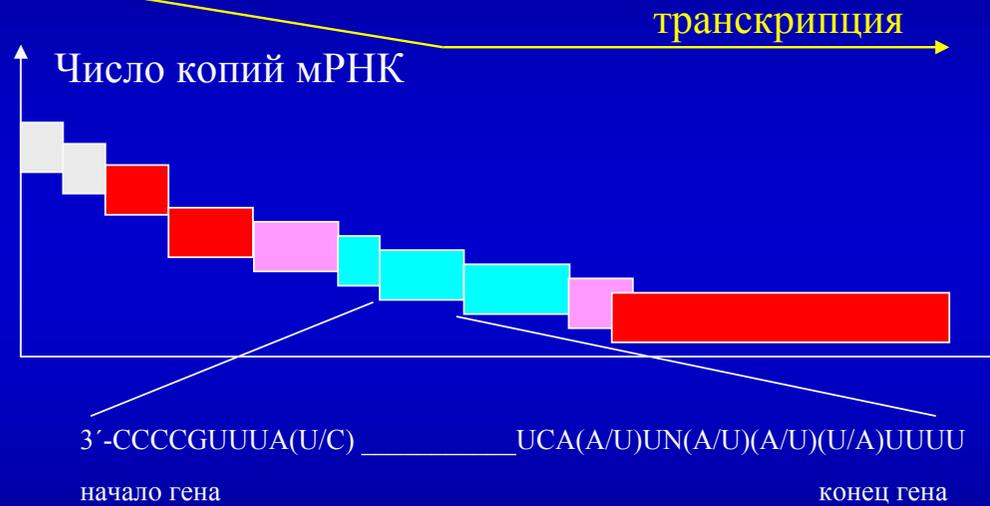
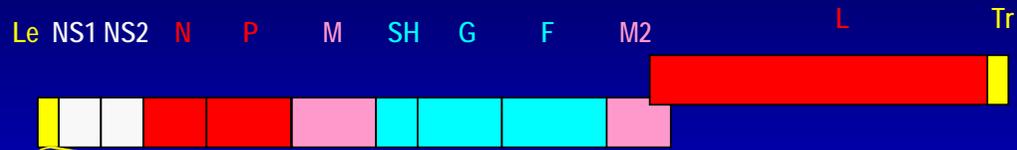
Институт вирусологии им. Д.И.Ивановского РАМН



Электронно-микроскопическая фотография клетки HeLa, зараженной РС-вирусом

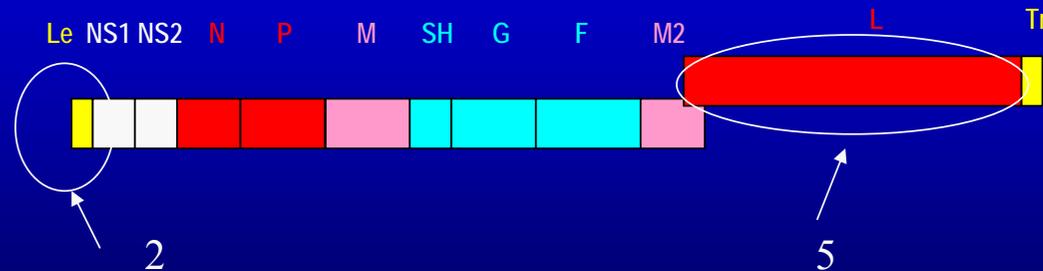


Схема репликации и транскрипции генома респираторно-синцитиального вируса





Ранее установлено: аттенуированный фенотип РС-вируса определяется комбинацией мутаций в лидерной последовательности и в гене РНК-полимеразы.

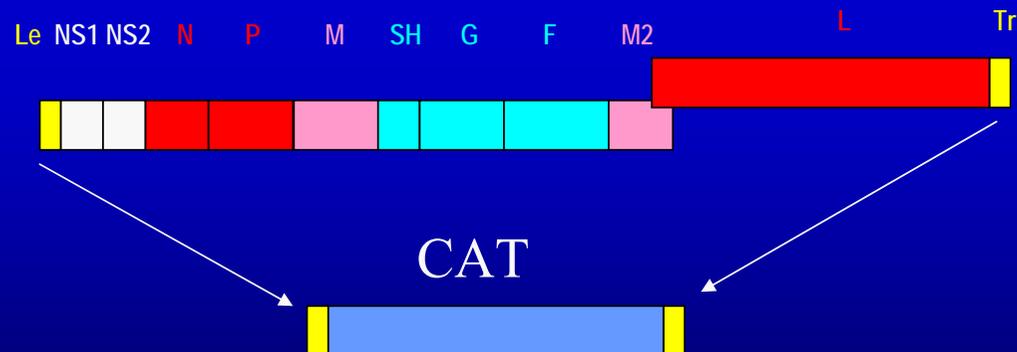




Институт вирусологии им. Д.И.Ивановского РАМН

Задачи исследования

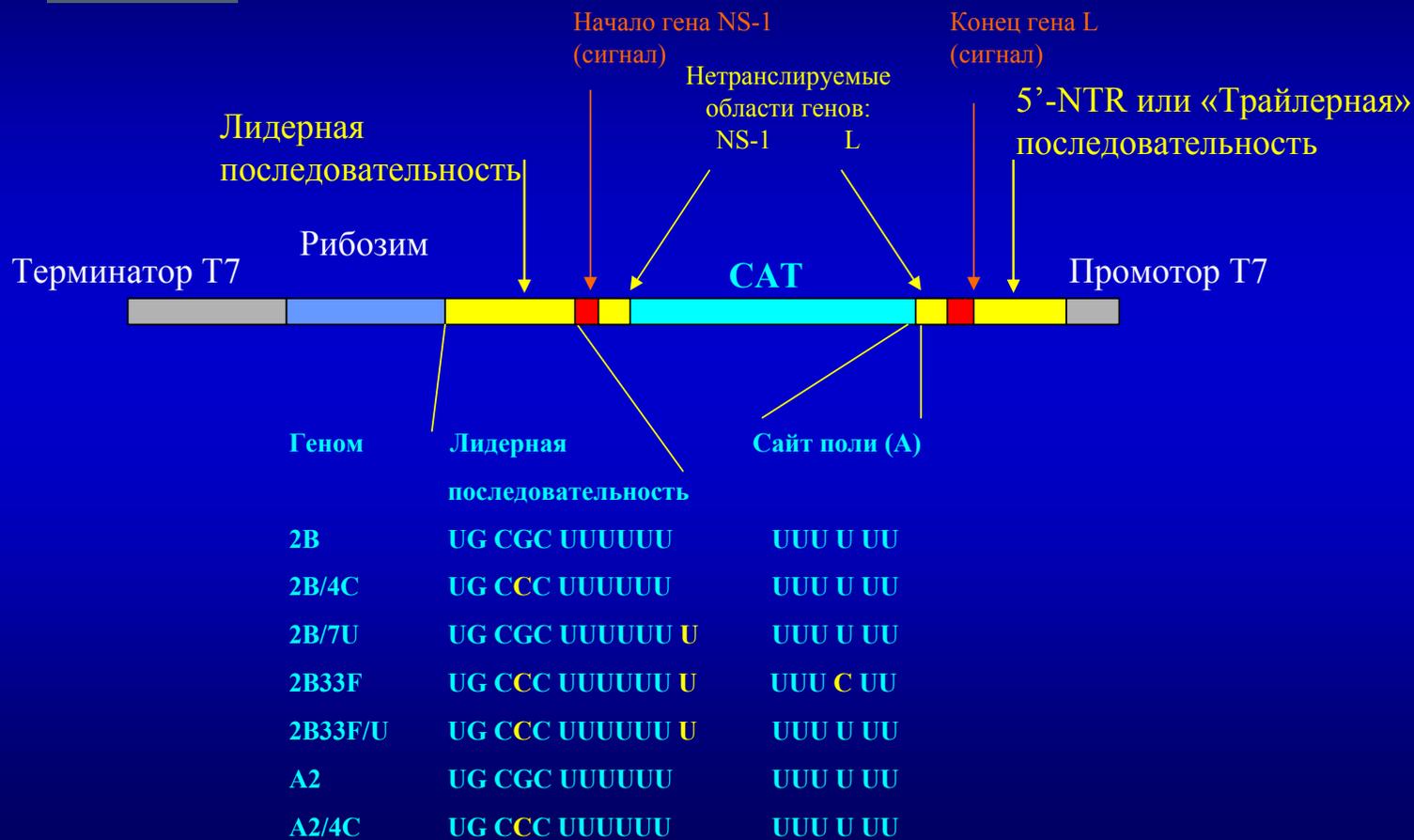
Сконструировать дефектные вирусные мини-геномы, содержащие репортерный ген хлорамфениколацетилтрансферазы и регуляторные области из вирулентного и аттенуированного штаммов РС-вируса человека.





Институт вирусологии им. Д.И.Ивановского РАМН

Структура мини-геномов РС-вируса



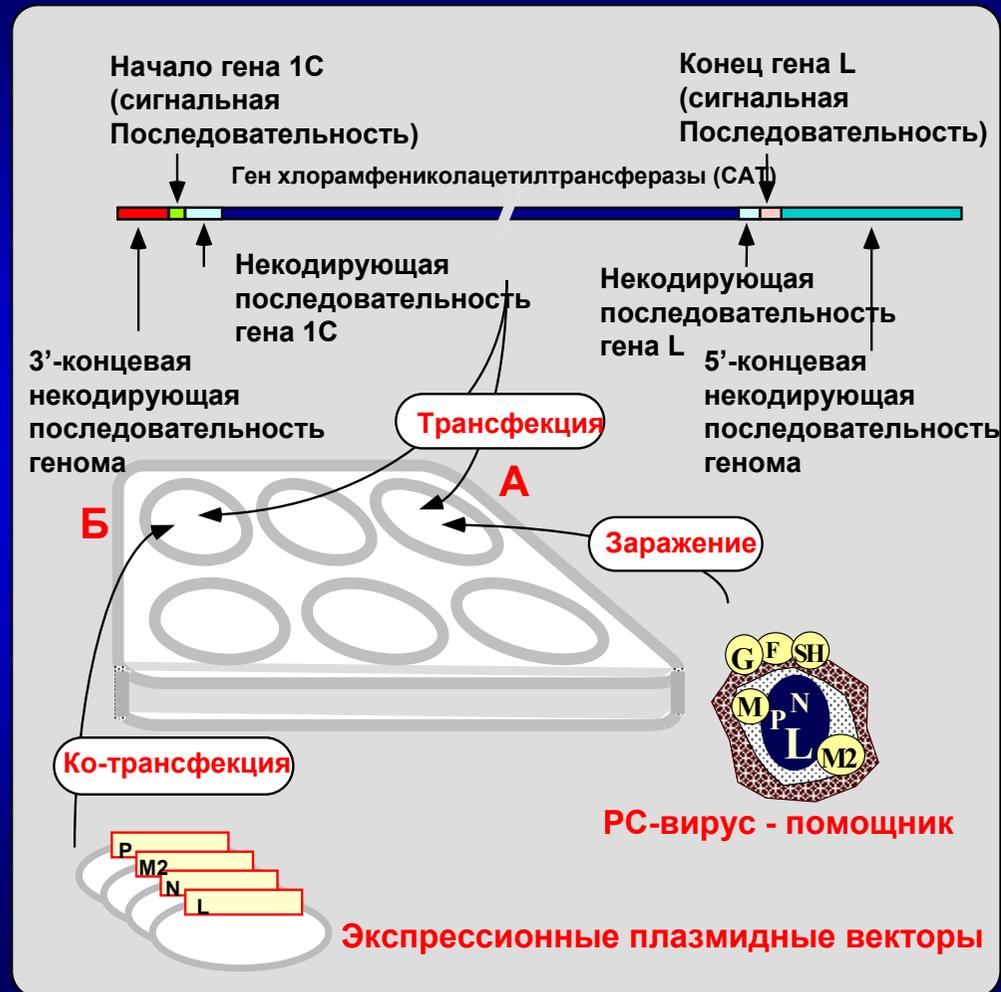
Условно-инфекционный минигеном РС-вируса со встроенным маркерным геном и схема его введения в чувствительные к РС-вирусу клетки

А

с одновременным заражением РС-вирусом

Б

с одновременным введением комплементирующ плазмид

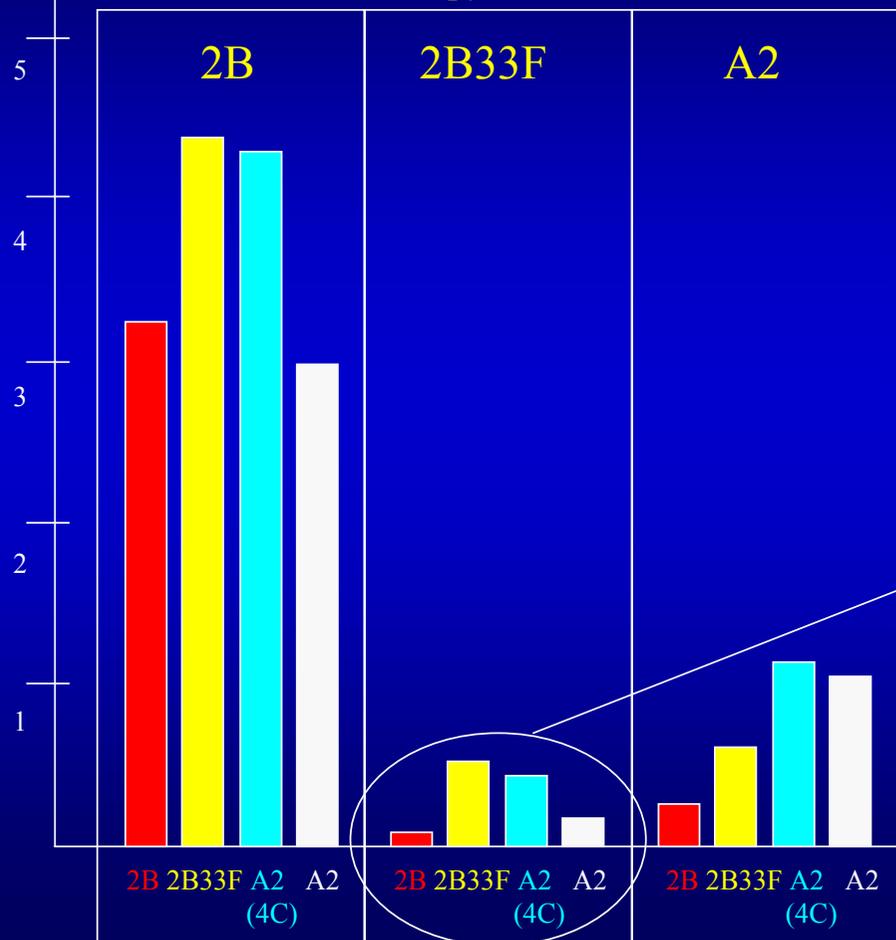


32°C

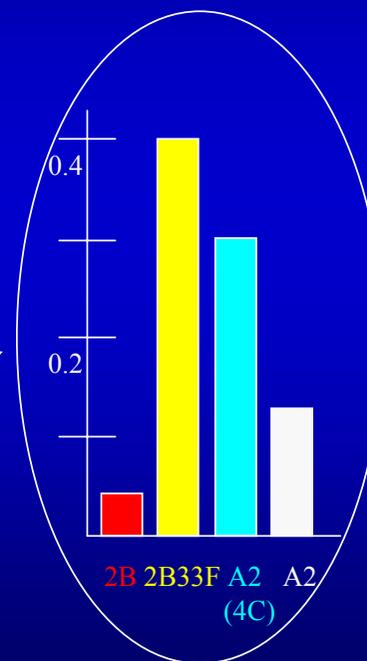
Институт вирусологии им. Д.И.Ивановского РАМН

¹⁴C cpm/ml

Штамм вируса-помощника



Анализ уровня экспрессии гена САТ в опытах с мини-геномами



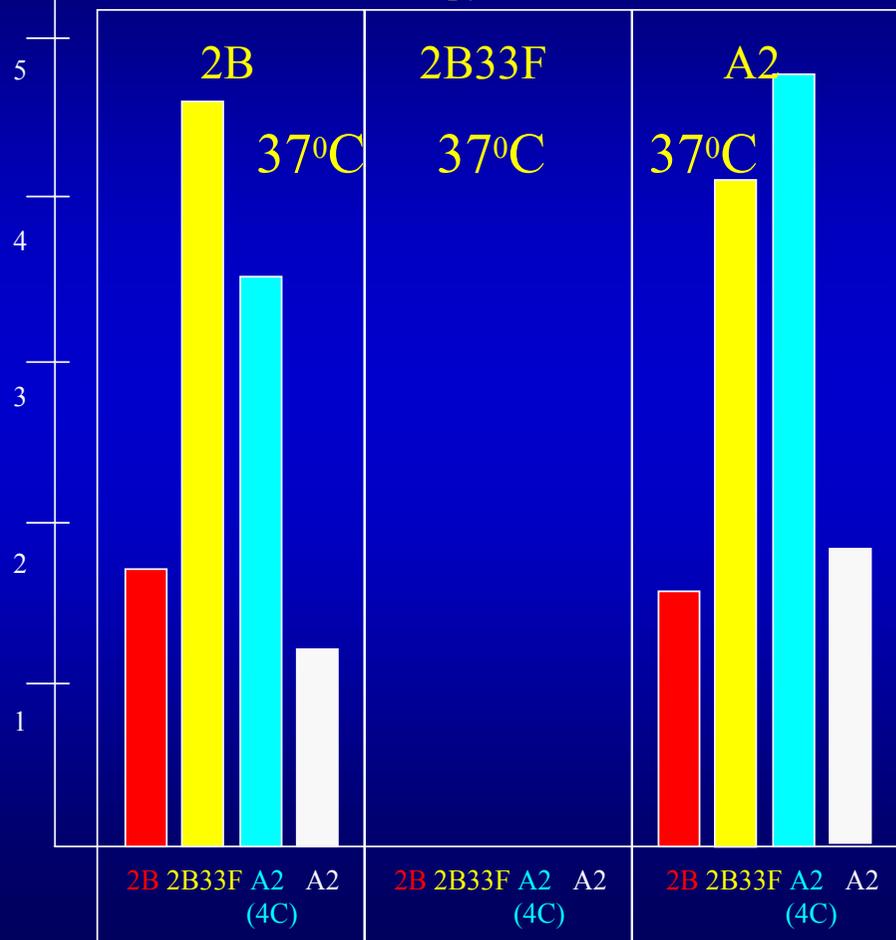
Лидерная последовательность

37°C

Институт вирусологии им. Д.И.Ивановского РАМН

¹⁴C cpm/ml

Штамм вируса-помощника



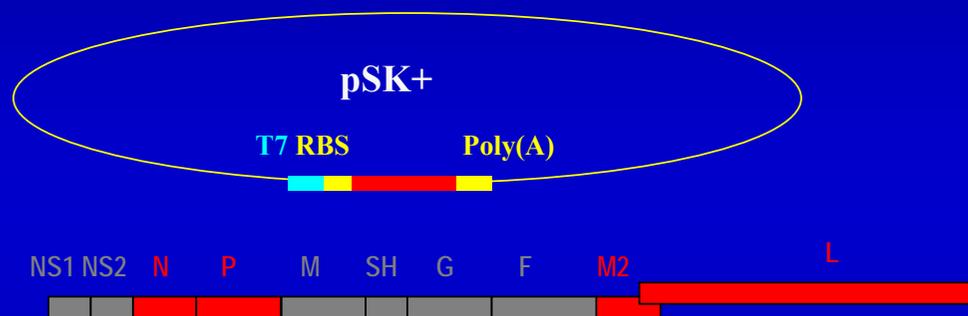
Анализ уровня экспрессии гена САТ в опытах с мини-геномами

Геном	Лидерная последовательность
2B	UG CGC UUUUUU
2B33F	UG <u>CC</u> UUUUUU <u>U</u>
A2	UG CGC UUUUUU
A2/4C	UG <u>CC</u> UUUUUU



Институт вирусологии им. Д.И.Ивановского РАМН

Конструирование экспрессионных векторов для синтеза белков репликативного комплекса РС-вирусов с целью обеспечения репродукции мини-геномов



№	название	Описание плазмиды
1	pRSV2B.N	Содержит ген N из штамма 2B
2	pRSV2B.M2(ORF1)	Содержит ген M2 (ORF1) из штамма 2B
3	pRSV2B.P	Содержит ген P из штамма 2B
4	pRSV2B.L	Содержит ген L из штамма 2B
5	pRSV2B33F.L	Содержит ген L из штамма 2B33F
6	pRSV2B33F TS(+).L	Содержит ген L из штамма 2B33F TS(+)

¹⁴C cpm/ml

Институт вирусологии им. Д.И.Ивановского РАМН

Анализ уровня экспрессии гена САТ в опытах с мини-геномами и экспрессирующими плазмидами

37°C





Институт вирусологии им. Д.И.Ивановского РАМН

**Примеры создания систем обратной генетики
для РНК-содержащих вирусов:**

Вирус классической чумы свиней

Вирус репродуктивного и респираторного синдрома
свиней



Классическая чума свиней (КЧС)

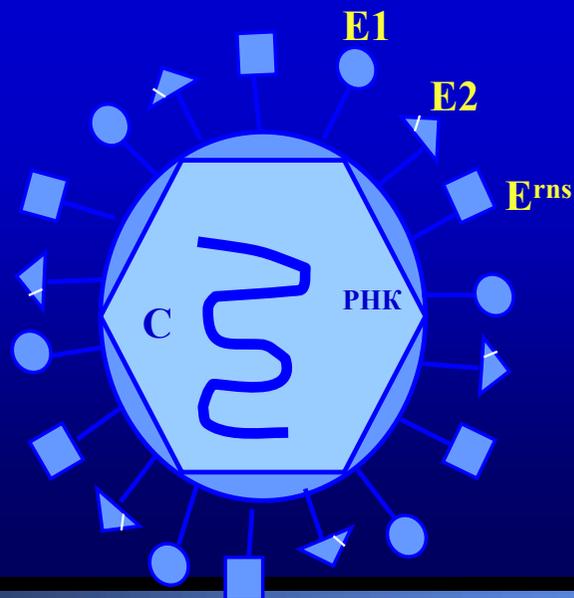
- **Классическая чума свиней представляет собой особо опасное заболевание.**
- **Болезнь протекает в острой, хронической и иннапарантной формах.**
- **Характеризуется высокой контагиозностью и летальностью (до 100%)**
- **Причиняет значительный экономический ущерб. (в Европе в 1997 г. убито 12 млн. свиней)**



Институт вирусологии им. Д.И.Ивановского РАМН

Возбудитель КЧС

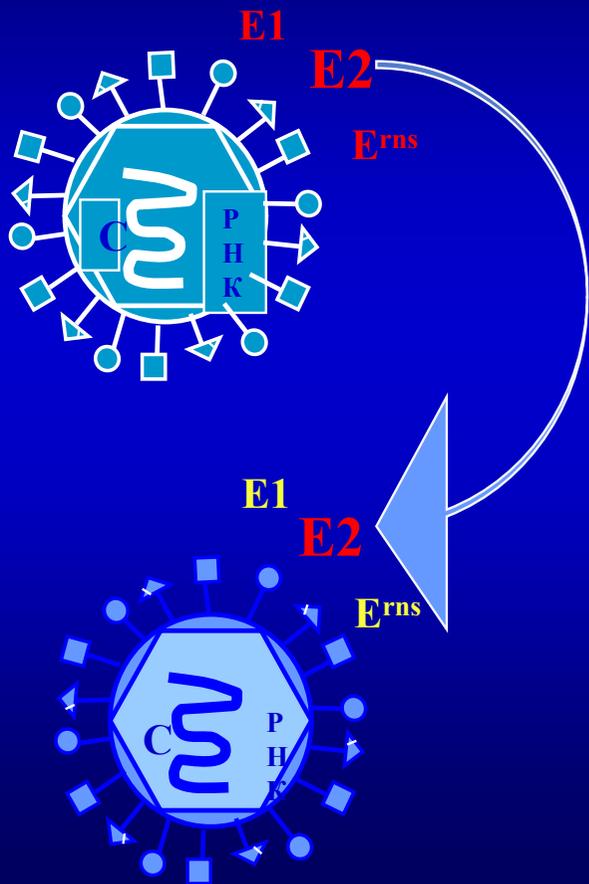
Вирус КЧС относится к роду *Pestivirus* семейства *Flaviviridae*





Институт вирусологии им. Д.И.Ивановского РАМН

Концепция маркированного вакцинирования



Результат применения ИФА :

Вакцинированные	-
Инфицированные	+



Институт вирусологии им. Д.И.Ивановского РАМН

Получение маркированной вакцины
на основе гибридного вируса
классической чумы свиней с геном
E2 из вируса диареи крупного
рогатого скота

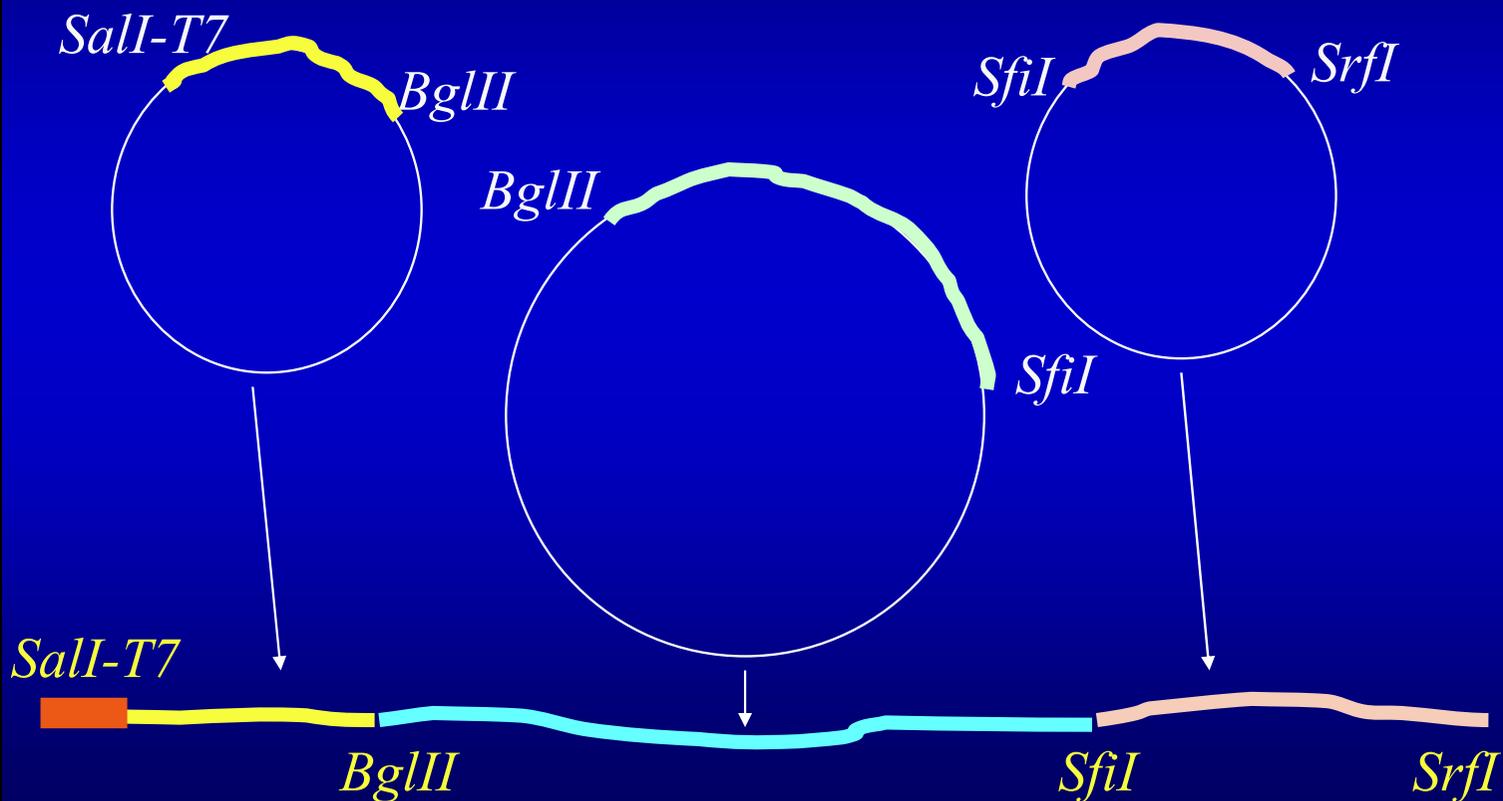


Получение трех перекрывающихся фрагментов кДНК для генома штамма КС методом полимеразной цепной реакции





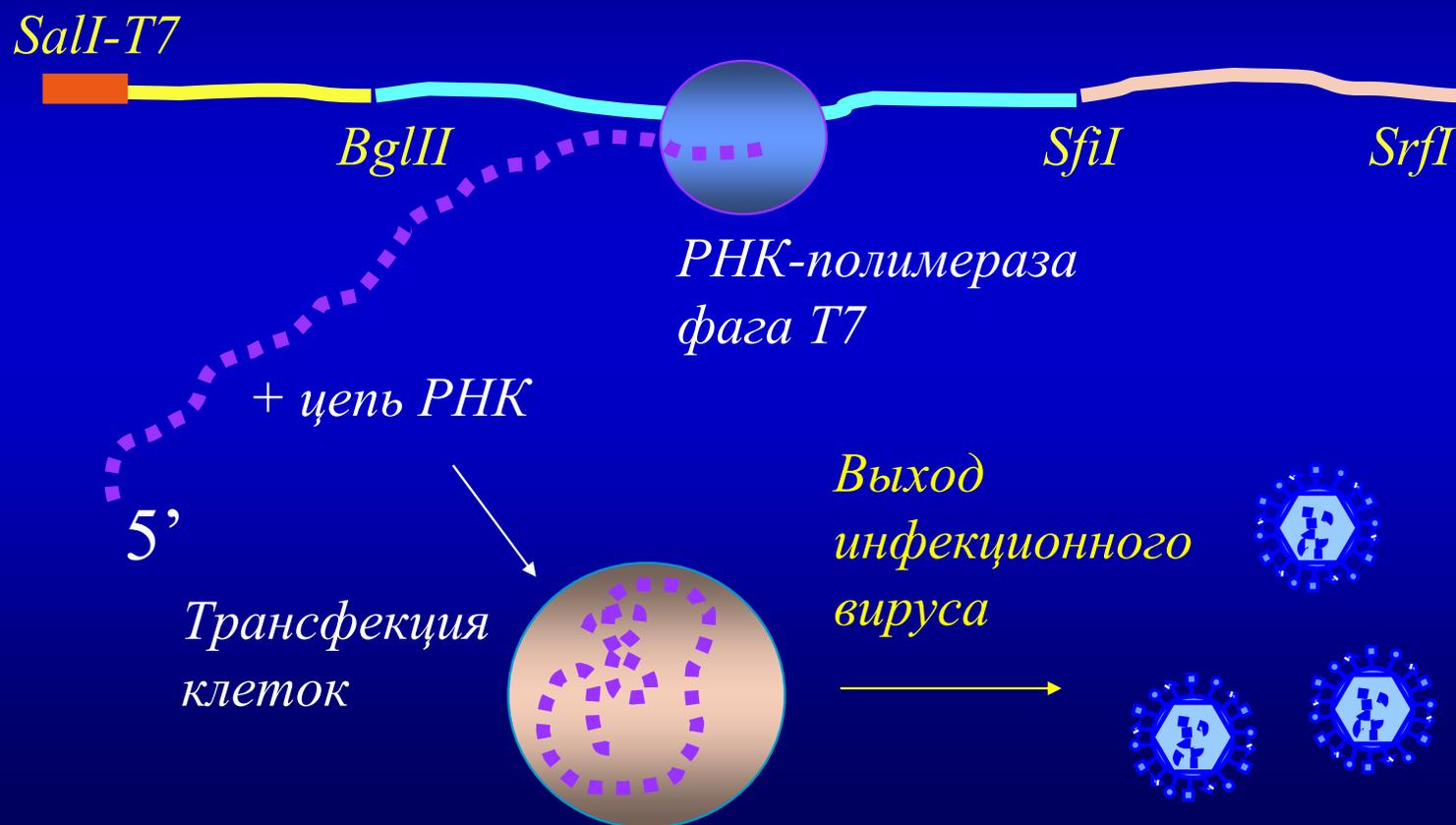
Сборка ДНК-копии генома штамма КС





Институт вирусологии им. Д.И.Ивановского РАМН

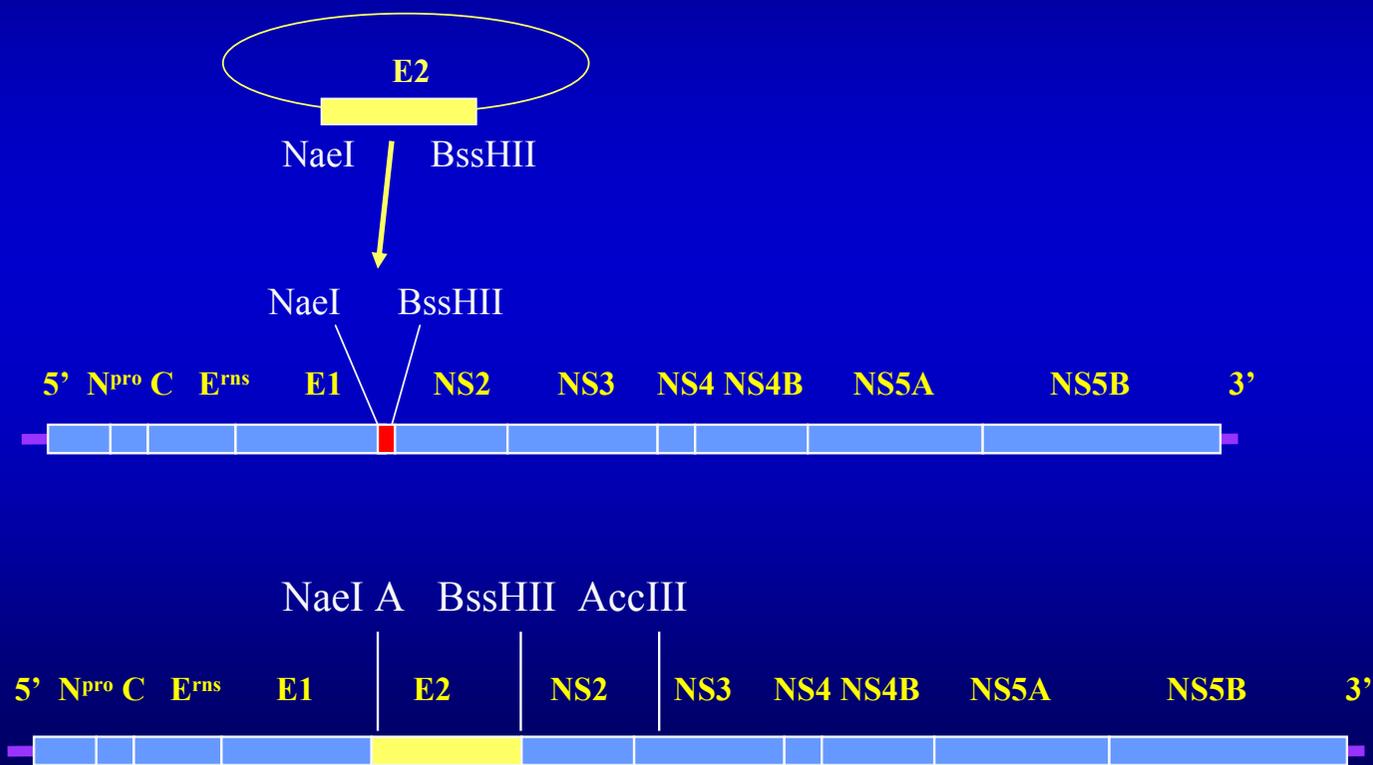
Получение РНК-копии генома штамма КС и инфекционного вируса

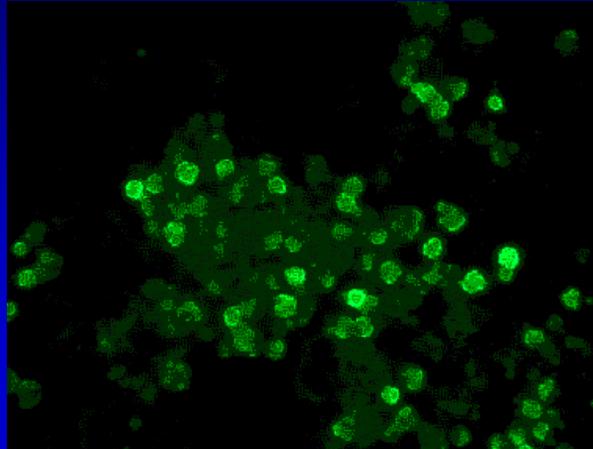




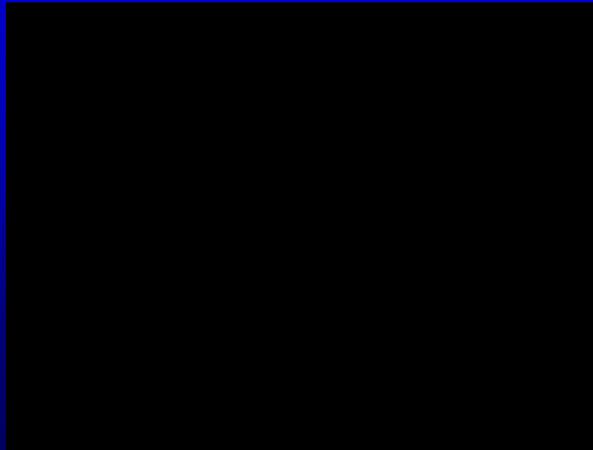
Институт вирусологии им. Д.И.Ивановского РАМН

Получение гибридного вируса классической чумы свиней с геном E2 из вируса диареи крупного рогатого скота

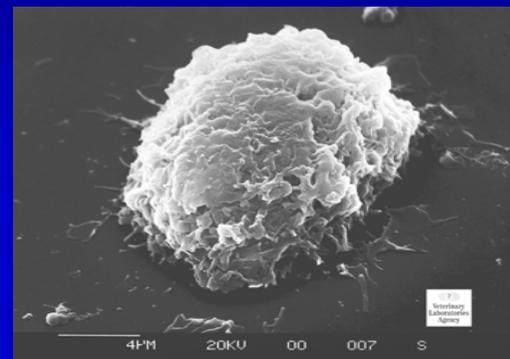
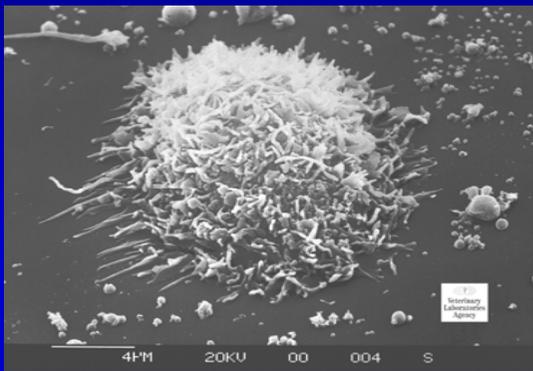




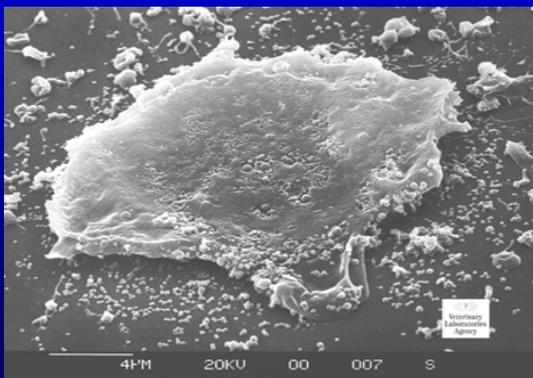
Результаты иммунофлуоресцентного окрашивания монослоя клеток РК-15 после трансфекции их рекомбинантной РНК-копией генома химерного вируса КЧС, содержащего чужеродный главный оболочечный гликопротеин Е2 вируса диареи КРС.



Репродуктивно-респираторный синдром свиней (PPRS)



24 ч.

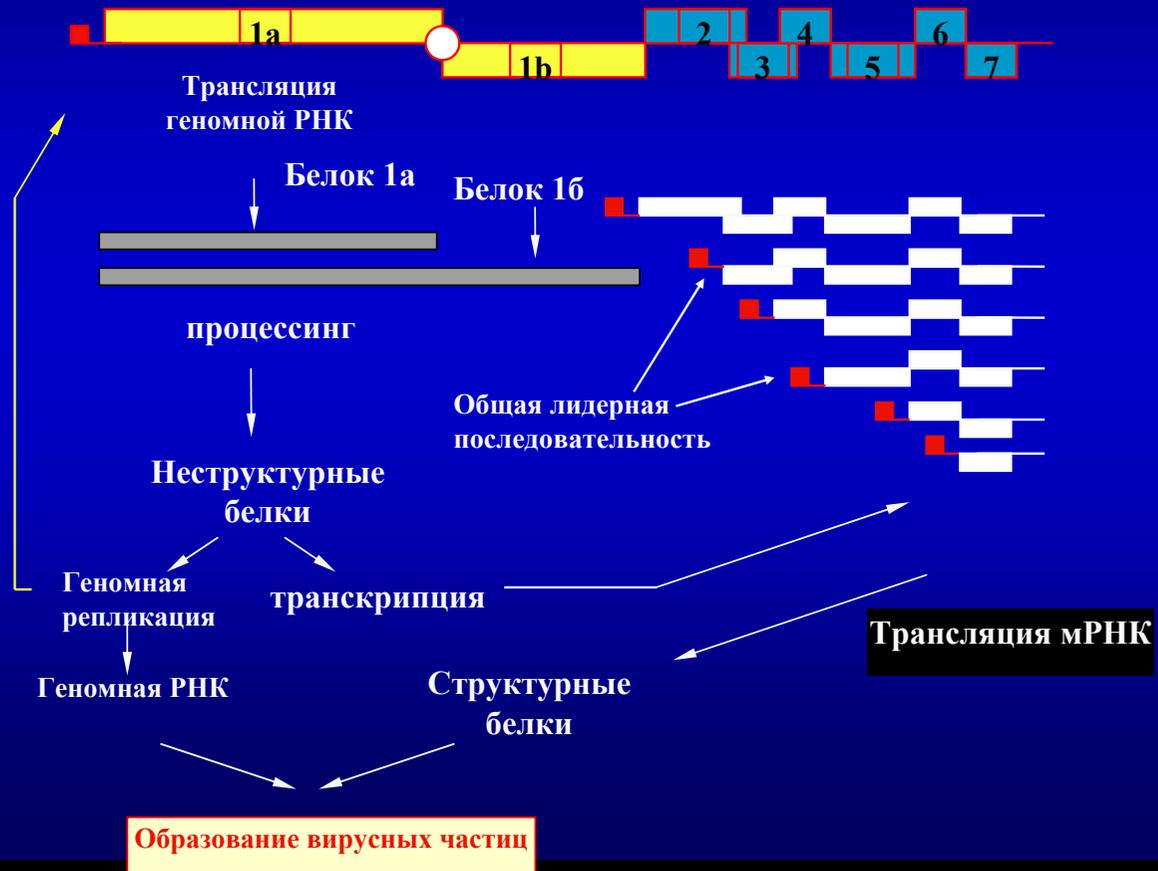


48 ч.





Геномная организация вируса РРСС

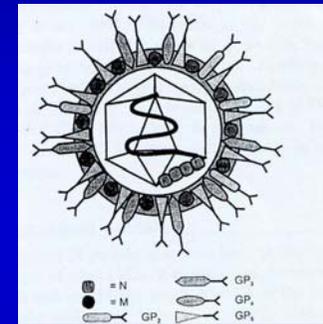


Система обратной генетики для внесения целенаправленных генетических изменений в РНК-геном вирусов

Инфекционный вирус



Инфекционный РНК геном



Инфекционный вирус

Библиотека полноразмерных копий
кДНК генома



Инфекционный РНК геном

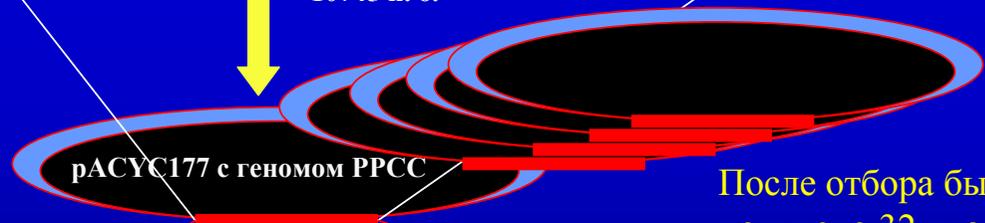


Библиотека полноразмерных копий генома аттенуированного штамма NADC8-251 вируса РРСС

T7 промотор



ПЦР-продукты



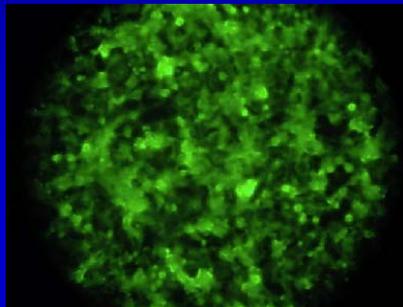
После отбора было получено 32 плазмиды

кДНК геном

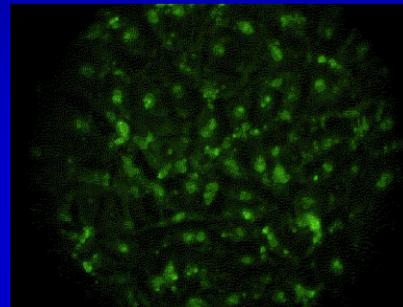


Рекомбинантные копии РНК вируса РРСС

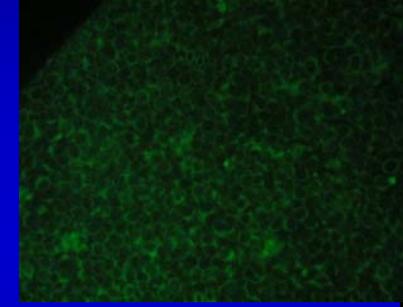
Частичная характеристика библиотеки плазмид,
содержащих полноразмерный геном кДНК
аттенуированного штамма NADC8-251 вируса РРСС.



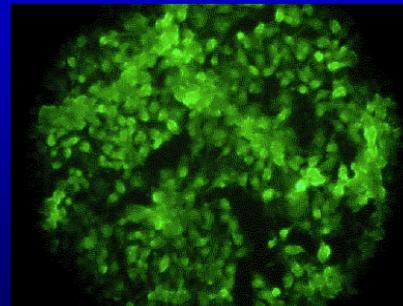
плазмида 257



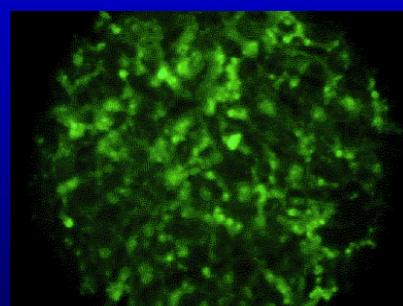
плазмида 25



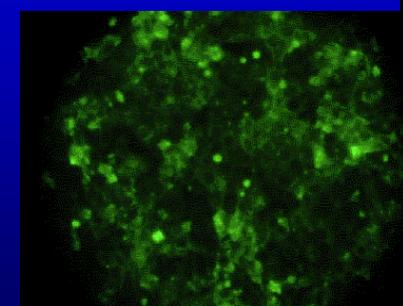
отрицательный контроль



плазмида 93



плазмида 141



положительный контроль



- Аттенуация РС-вируса связана со снижением уровня репликации геномной РНК, которое вызвано комбинацией мутаций 4 и 7 нуклеотидов в лидерной последовательности и заменой 451 аминокислоты в гене РНК-полимеразы.
- Получен жизнеспособный гибридный вирус классической чумы свиней с чужеродным главным оболочечным гликопротеином
- Получен жизнеспособный гибридный вирус репродуктивного и респираторного синдрома свиней

На очереди

Химерный штамм вируса КЧС/РРСС

Химерный штамм вируса КЧС/Цирковируса 2 типа