



УДК 577.152.321:577.113.5

ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА ПОЛНОРАЗМЕРНОЙ ДНК-КОПИИ ГЕНА НЕЙРАМИНИДАЗЫ ВИРУСА ГРИППА А/КИЕВ/59/79 (Н1N1)

*Беклемишев А. Б., Блинов В. М., Василенко С. К.,
Головин С. Я., Каргинов В. А., Маммаев Л. В.,
Нетесов С. В., Петров Н. А., Сафронов П. Ф.*

*Всесоюзный научно-исследовательский институт молекулярной биологии,
пос. Кольцово Новосибирской обл.*

Вирион гриппа содержит два поверхностных антигена — гемагглютинин и нейраминидазу (NA), изменения в структуре которых позволяют вирусу преодолевать иммунитет популяции. Ранее нами была определена первичная структура гена нейраминидазы (ген NA) штамма А/Хабаровск/034457/77 (Хабаровск/77) антигенного подтипа Н1N1, вновь вернувшегося в 1977 г. [1]. С целью изучения изменчивости этого антигена в настоящей работе определена полная первичная структура гена NA штамма А/Киев/59/79 (Н1N1).

Для наработки вирусной РНК были использованы вакцинный штамм А/Киев/59/79/R, являющийся рекомбинантом вирусов А/Киев/59/79 и А/PR/8/34; меченые [α - 32 P] дезоксирибонуклеозидтрифосфаты отечественного производства. Подробные методики очистки вируса, выделения вирусной РНК, получения кДНК, клонирования и определения первичной структуры приведены в нашей предыдущей работе [2]. Клон, несущий полноразмерную ДНК-копию гена NA штамма А/Киев/59/79, был отобран по результатам гибридизации колоний с радиоактивными фрагментами кДНК гена NA родственного штамма А/Хабаровск/77.

Стратегия определения первичной структуры изображена на рис. 1. Более $\frac{3}{4}$ структуры установлено по двум комплементарным цепям. Некоторые участки последовательности были также дополнительно проверены определением первичной структуры ДНК из двух других независимых клонов. Установлена первичная структура полноразмерной ДНК-копии гена NA штамма А/Киев/59/79 (рис. 2).

Ген NA штамма А/Киев/59/79 отличается от аналогичного гена штамма А/Хабаровск/77 всего по восьми нуклеотидам, из которых три приводят к изменению аминокислот. При сравнении с генами NA штаммов А/PR/8/34 [3] и А/FW/1/50 [4] оказалось, что в гене NA более позднего штамма А/Киев/59/79 на шесть нуклеотидных отличий меньше, чем в гене более раннего изолята А/Хабаровск/77. Это свидетельствует в пользу различия эволюционных путей этих вирусов.

Отличительной особенностью нейраминидазы штамма А/Киев/59/79 является мутация Leu 250 → Gln (аналог положения 249 в структуре ней-

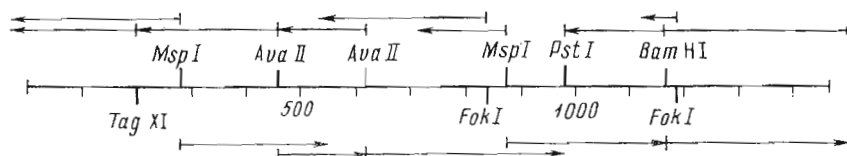


Рис. 1. Стратегия определения первичной структуры гена нейраминидазы штамма А/Киев/59/79. Изображены только сайты расщепления теми рестриктовыми эндонуклеазами, которые были использованы при определении структуры. Стрелки указывают направление чтения последовательности нуклеотидов и размеры расшифрованного участка

	M N P N Q K I I T I G S I	13
AGCAAAAGCAGGAGTTTAAATGAATCCAAATCAGAAAATAATAACCATTGGTTCAATCT		1 60
	A	2
.....	A	3
C M A I G I I S L I L Q I G N I I S I W		33
GTATGGCAATCGGAATAATTAGTCTAATATTGCCAAATAGGGAATATTATCTCAATATGGG		1 120
		2
		3
V S H S I Q T G S Q N H T G I C N Q R I		53
TTAGCCACTCAATTCAAACTGGAAGTCAAAACCATACTGGAATATGCAACCAAAGAATCA		1 180
	A	2
	A	3
I T Y E N S T W V N Q T Y V N I S N T N		73
TTACSTATGAAAATAGCACCTGGGTAATCAAACATATGTTAATATTAGCAACACTAACG		1 240
		2
		3
V V A G K D T T S M T L A G N S S L C P		93
TTGTTGCTGGAAAGGACACAACCTCAATGACATTAGCCGGCAATTCATCTCTTTGTCSTA		1 300
		2
		3
I R G W A I Y S K D N S I R I G S K G D		113
TCCGTGGGTGGCTATATACAGCAAAGACAACAGCATAAGAATTGGTTCCAAAGGAGATG		1 360
		2
		3
V F V I R E P F I S C S H L E C R T F F		133
TTTTTGTCAATAAGAGAACCTTTTATATCATGTTCTCACTTGGAATGCGAACCTTTTTTC		1 420
		2
		3
L T Q G A L L N D K H S N G T V K D R S		153
TGACCAAGGCGCTCTATTAATGACAAGCATTCAAATGGGACCGTTAAGGACAGAAGCC		1 480
		2
		3
P Y R A L M S C P I G E A P S P Y N S R		173
STTATAGGGCCTTAATGAGCTGTCCSTATAGGTGAAGCTCCGCTCCATACAATTCAAGGT		1 540
	G	2
	A	3
F E S V A W S A S A C H D G M G W L T I		193
TTGAATCGGTTGCTTGGTCAGCAAGTGCATGTCATGGCATGGGCTGGCTAACAAATCG		1 600
	C	2
	T C	3
G I S G P D D G A V A V L K Y N G I I T		213
GAATTTCTGGTCCAGATGATGGAGCAGTGGCTGTACTAAAATACAACGGCATAATAACTG		1 660
		2
		3
E T I K S W R K Q I L R T Q E S E C V C		233
AAACCATAAAAAGTTGGAGGAAGCAAATATTAAGAACACAAGAGTCTGAATGTCTCTGTG		1 720
		2
		3

раминидазы антигенного подтипа N2). На модели третичной структуры, определенной для нейраминидазы подтипа N2 [5], этот остаток расположен на поверхности глобулы и может быть доступен для антител, однако у подтипа N2 изменчивость аминокислот в этом участке незначительна и моноклональных вариантов по данному положению не обнаружено. В то же время у представителей подтипа N1 аминокислотные остатки в положении 250 активно изменяются. Так, в нейраминидазе штамма А/Хабаровск/77 имеется замена Leu²⁵⁰ → Pro, а в нейраминидазе вируса попугая — такая же замена Leu²⁵⁰ → Gln [6]. Вероятно, конформация поверхностной петли в этом участке у двух подтипов различается, что и приводит к увеличению антигенной значимости этой области для подтипа N1 наряду с уже отмеченной нами областью 382–390 [1].

Сравнение первичной структуры гена NA исследованного нами ранее штамма Хабаровск/77 с геном NA вируса А/СССР/90/77 [7] выявило в нем 16 нуклеотидных замен, приводящих к 11 заменам аминокислот, тогда как

V N G S C F T I M T D G P T D G Q A S Y	253
TAAACGGTTCATGTTTTACCATAATGACCGATGGCCCGAGTGATGGGCAGGCCTCGTACA	1 780
	2
	3
R I F K I E K G K I T K S I E L D A P N	273
GAATCTTCAAAATCGAGAAGGGGAAGATTACTAAATCAATAGAGTTGGATGCACCCAATT	1 840
	2
	3
S H Y E E C S C Y P D N G T V M C V C R	293
CTCATTACGAGGAATGTTCTCTGTACCAGACAACGGCACAGTGATGTGTGTGTGCAGAG	1 900
	2
	3
D N W H G S N R P W V S F N Q N L D Y Q	313
ACAATTGGCATGGTTCGAATCGACSTTGGGTGTCTTTTAATCAAAACCTGGATTATCAAA	1 960
	2
	3
I G Y I C S G V F G D N P R P K D G K G	333
TAGGATACATCTGCAGTGGGGTTTTCGGTGACAATCCGCGTCCCAAAGATGAAAAGGCA	1 1020
	2
	3
S C D P V N V D G A D G V K G F S Y R Y	353
GCTGTGATCCAGTAAATGTTGATGGAGCAGACGGAGTAAAGGGTTCATACAGGTATG	1 1080
	2
	3
A	A
G N G V W I G R T K S N S S R K G F E M	373
GTAATGGTGTGGATAGGAAGGACTAAACTAACAGCTCCAGAAAGGGATTTGAGATGA	1 1140
	2
	3
T W D P N G W T D T D S N F L V K Q D V	393
TTTGGGATCCTAATGGATGGACAGATACCGATAGTAATTTCTTAGTGAACAGGATGTAG	1 1200
	2
	3
V A M T D W S G Y S G S F V Q H P E L T	413
TGGCAATGACTGATGGTTCAGGGTACAGCGGAAGTTTCGTTCAACATCCTGAGCTAACAG	1 1260
	2
	3
G L D C M R P C F W V E L I R G R P R E	433
GATGGACTGTATGAGGCCCTGCTTCTGGGTTGAATTAATCAGAGGACGACCCAGAGAAA	1 1320
	2
	3
K T T I W T S G S S I S F C G V N S D T	453
AAACAACAATCTGGACTAGTGGGAGCAGCATTTCTTTTGTGGCGTGAATAGTGACTG	1 1380
	2
	3
V N W S W P D G A E L P F T I D K	470
TAAATGGTCTTGGCCAGACGGTCTGAGTTGCCATTACCATTGACAAGTAGTCCGTTA	1 1440
	2
	3
AAAAAACTCSTTGTCTTCTACT	1 1461
+	2 -
.....	3

Рис. 2. Первичная структура позитивной цепи ДНК-копии гена нейраминидазы штамма А/Киев/59/79 (строка 1) в сравнении с аналогичными генами штаммов А/Хабаровск/77 (строка 2) и А/СССР/90/77 (строка 3). Приведены нуклеотидные замены в соответствующих положениях. Выше изображена аминокислотная последовательность белка в однобуквенном коде [8]. Точками обозначены отсутствующие в работе [7] участки последовательности, знаком «+» отмечено наличие дополнительного остатка А в этой области в гене NA штамма А/Хабаровск/77

обычно число аминокислотных замен составляет $1/3-1/2$ от числа нуклеотидных. На модели третичной структуры белка [5] 7 из 11 замен расположены во внутренних областях глобулы. Как уже отмечалось [1], аминокислотные остатки в этих областях характеризуются повышенной консервативностью, и два таких далеких изолята, как А/PR/8/34 и А/Хаба-

ровск/77, имеют в этом участке всего 10 различий. Особое внимание привлекает замена Trp¹⁹⁰ → Cys, поскольку этот остаток входит в состав дипептида Trp-Leu, который сохраняется у всех до сих пор исследованных нейраминидаз подтипов N1 и N2. Необычно и расположение нуклеотидных различий: 14 из них группируются в четырех кластерах размером 20–50 нуклеотидных остатков, причем сами кластеры расположены также случайно — на расстоянии, кратном 200 н.п., в районе ~600, 1000, 1200 и 1400 н.п. от 5'-конца гена.

При анализе гена нейраминидазы в работе [7] был применен метод дидезокситерминации с использованием синтетических праймеров. При таком методе положение соседних праймеров на исследуемой структуре определяется разрешающей способностью секвенирующих гелей, и расстояние между ними обычно не превышает 150–250 нуклеотидов. Поэтому не исключено, что большинство нуклеотидных различий в рассматриваемых структурах явилось следствием ошибочной интерпретации авторами [7] автордиографов секвенирующих гелей в местах предельной разрешимости полос.

Авторы выражают благодарность Л. С. Сандахчиеву за постоянную поддержку в работе, Б. Г. Гриненкову за содействие в обеспечении вирусным материалом, С. Х. Дегтяреву и Н. А. Нетесовой за предоставление высокоочищенных препаратов рестриктаз.

ЛИТЕРАТУРА

1. Беклемишев А. Б., Блинов В. М., Василенко С. К., Головин С. Я., Каргинов В. А., Мамаяев Л. В., Микрюков Н. Н., Нетесов С. В., Петренко В. А., Фролов Н. В. *Биоорганическая химия*, 1985, т. 11, № 5, с. 628–635.
2. Беклемишев А. Б., Блинов В. М., Василенко С. К., Головин С. Я., Гугоров В. В., Каргинов В. А., Мамаяев Л. В., Микрюков Н. Н., Нетесов С. В., Петренко В. А., Петров Н. А., Сандахчиев Л. С. *Биоорганическая химия*, 1984, т. 10, № 11, с. 1535–1543.
3. Fields S., Winter G., Brownlee G. G. *Nature*, 1981, v. 290, p. 213–217.
4. Air G. M., Blok J., Hall R. M. In: *The replication of negative strand viruses*/Eds Bishop D., Compans R. Elsevier, North Holland, 1981, p. 225–239.
5. Varghese J. N., Laver W. G., Colman P. M. *Nature*, 1983, v. 303, p. 35–40.
6. Steuler H., Rohde W., Scholtissek C. *Virology*, 1984, v. 135, № 1, p. 118–124.
7. Concannon P., Kwolek C. J., Salser W. A. J. *Virology*, 1984, v. 50, № 2, p. 654–656.
8. *Eur. J. Biochem.*, 1984, v. 138, № 1, p. 9–37.

Поступило в редакцию
6.V.1985

NUCLEOTIDE SEQUENCE OF A FULL-LENGTH DNA COPY OF THE INFLUENZA VIRUS A/KIEV/59/79 (H1N1) NEURAMINIDASE GENE

BEKLEMISHEV A. B., BLYNOV V. M., VASSILENKO S. K., GOLOVIN S. Ya.,
KARGINOV V. A., MAMAYEV L. V., NETESOV S. V., PETROV N. A., SAFRONOV P. F.

*All-Union Research Institute of Molecular Biology,
Kol'tsovo, Novosibirsk Region*

The complete nucleotide sequence of the cloned full-length DNA copy of the influenza virus A/Kiev/59/79 (H1N1) neuraminidase gene has been determined. The comparison with the other neuraminidases reveals the differences in localization of antigenic determinants between N1 and N2 subtypes and divarication of evolutionary pathways of the modern H1N1-influenza viruses.