



УДК 578.832.1А:578.224'242.4:577.215

**СИНТЕЗ, КЛОНИРОВАНИЕ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПЕРВИЧНОЙ  
СТРУКТУРЫ ПОЛНОРАЗМЕРНОЙ ДНК-КОПИИ ФРАГМЕНТА  
8 ГЕНОМА ВИРУСА ГРИППА А**

*Беклемишев А. Б., Блинов В. М., Василенко С. К.,  
Головин С. Я., Каргинов В. А., Мамаев Л. В.,  
Микрюков Н. Н., Нетесов С. В., Петренко В. А.,  
Петров Н. А., Фролов И. В.*

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

Проведены синтез, клонирование и определение первичной структуры полноразмерной ДНК-копии фрагмента 8 генома вируса гриппа типа А. У гипотетического белка, кодируемого (-)цепью фрагмента 8, обнаружен участок, гомологичный активному центру трипсина.

Ранее [1–3] нами была определена полная нуклеотидная последовательность генов трех белков – гемагглютинина (НА), нейраминидазы (НА) и NP-белка – из ДНК вакцинного штамма вируса гриппа H1N1-подтипа X/Ленинград/54/1, который является рекомбинантом штаммов A/PR/8/34 и A/Хабаровск/34457/77, отобранным по антигенным свойствам штамма A/Хабаровск/34457/77. Чтобы определить происхождение каждого из генов этого рекомбинанта, в настоящей работе мы установили полную нуклеотидную последовательность фрагмента 8 генома штамма X/Ленинград/54/1.

Подробные методики клонирования ДНК, комплементарной тотальной вирионной РНК, приведены в работе [1]. После селекции клонов, содержащих последовательности генов НА, НА, NP-белка [1–3], оставшиеся плазмидные ДНК были подвергнуты картированию с помощью рестриктаз *PstI*, *BamHI*, *HindIII*, *AvaII*, *MspI*. В результате такого анализа и предварительного секвенирования были отобраны два клон, содержащие последовательность фрагмента 8. Секвенирование осуществляли по модифицированному методу Максама – Гилберта [4, 4]. Оба клон содержали полную копию фрагмента 8. По двум независимым клоном было определено ~25% нуклеотидной последовательности. Разницы между ними не обнаружено. Комплементарную цепь секвенировали только для прочтения участков с «компрессией» [5]; по двум цепям определено ~25% последовательности фрагмента 8. Стратегия секвенирования изображена на рис. 1. Расшифрованная нами полная первичная структура фрагмента 8 генома штамма X/Ленинград/54/1 приведена на рис. 2 в форме (+)-цепи длиной 890 нуклеотидов.

С учетом сплайсинга [6] в последовательности (+)-цепи имеется две рамки трансляции – нуклеотиды 26–716 и 26–56+528–861, которые кодируют соответственно белок NS1 (230 аминокислот) и NS2 (121 аминокислота).

По сравнению с аналогичным геном штамма A/PR/8/34 (вариант Cambridge) [7] имеется 11 нуклеотидных замен, из которых только три приводят к отличию аминокислотной последовательности. В NS1 это замены Glu-55→Lys и Glu-101→Asp в NS2 – замена Val-89→Ile. С вариантом Mount Sinai (США) этого же штамма имеется только пять нуклеотидных замен, из которых две приводят к изменению аминокислот Glu-55→Lys в NS1 и Gly-26→Glu в NS2 [8]. В то же время у штамма A/USSR/90/77, филогенетически близкого к штамму A/Хабаровск/34457/77 [1, 2], 20 аминокислотных замен в белке NS1 и 7 – в NS2 [9] в сравнении с A/PR/8/34.

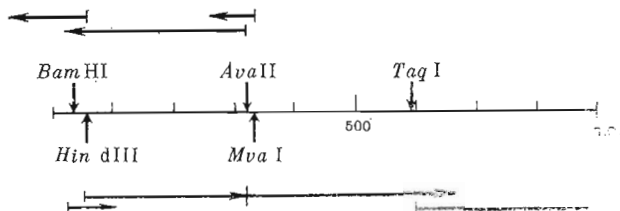


Рис. 1. Схема стратегии секвенирования. Отмечены только сайты узнавания рестриктаз, использованных при определении структуры. Стрелки показывают направление секвенирования и размеры секвенированной области меченых по 3'-концу фрагментов рестрикции

AGCAAAGCAGGGTGCASAAAACATAATGGATCCAAACACTGTGTCAAGCTTTCAGGTAG 60  
 G  
 ATTGCTTTCTTTGGCATGTCCGCAAACGAGTTGCAGACCAAGAAGTAGGTGATGCCCCAT 120  
 TCSTTGATCGGCTTCGCCGAGATCAGAAATCCSTAAGAGGAAGGGGCAGTACTCTCGGTC 180  
 C T  
 TGGACATCAAGACAGCCACACGCTGCTGGAAAGCAGATAGTGGAGCGGATTCSTAAGAAG 240  
 G  
 AATCCGATGAGGCASCTAAATGACCATGGCCTCTGTACCTGGTTCGGGTACCTAACTC 300  
 ACATGACTCTTGAGGAAATGTCAAGGGACTGGTCCATGCTCATACCCCAAGCAGAAAGTGG 360  
 A  
 CAGGCCCTCTTTGTATCAGAATGGACCAGGCGATCATGGATAAGAACATCATACTGAAAG 420  
 A  
 CGAACTTCAGTGTGATTTTTGACCGGCTGGAGACTCTAATATTGCTAAGGGCTTTCACCG 480  
 AAGAGGGAGCAATTGTTGGCGAAATTTACCATTGCCTTCTCTCCAGGACATACTGCTG 540  
 AGGATGTCAAAAATGCAGTGGAGCTCCTCATCGGAGGACTGCAATGGAATGATAACACAC 600  
 TTCCAGTCTCTGAAACTCTACAGAGATTCCGTTCCGACAAGCCTGATGAGAATGGGAGAC 660  
 CTCCACTCACTCCAAAACAGAAAACGAGAAATGGCGGGAACAAATTAGGTCAGAAAGTTGAA 720  
 GAAATAAGATGGTTGATTGAAGAAGTGAGACASAAACTGAAGATAACAGAGAAATAGTTT 780  
 G  
 GACCAAATAACATTTATGAAGCCTTACATCTATTGCTTGAAGTGGAGCAAGAGATAAGA 840  
 ACTTCTCGTTTCAGCTATTGTAAGTAAATAAACACCCCTGTTTCTACT  
 A A A

Рис. 2. Нуклеотидная последовательность фрагмента 8 генома штамма X/Ленинград/54/1 в форме (+)-цепи. Внизу приведены нуклеотидные замены для соответствующего гена штамма A/PR/8/34 варианта Cambridge

Таким образом, донором фрагмента 8 в геноме рекомбинанта является штамм A/PR/8/34 (вариант СССР) [3], более близкий к варианту Mount Sinai.

К настоящему моменту известны полные нуклеотидные последовательности NS-генов нескольких штаммов вируса гриппа [6–12]. Сравнение их приведено в работе [9]. Все белки исследованных штаммов весьма сходны между собой. На этом фоне резко выделяются только сильно отличающиеся от всех гены штаммов вируса типа В [12] и A/duck/Alberta/60/76 [11]. Для последнего показано также, что его белок NS1 антигенно значительно отличается от остальных NS1-белков вирусов типа А [13].

Именно для группы вирусов со сходными белками NS1 и NS2 было высказано предположение о наличии у них еще одного белка — NS3, кодируемого (–)-цепью фрагмента 8 [8]. В (–)-цепи всех этих штаммов имеется протяженная рамка трансляции — нуклеотиды 793–293 в ранних изолятах (до 1935 г.) и 793–146 в поздних изолятах вируса (после 1942 г.), в пределах которой может кодироваться белок размером соответственно 167 и 216 аминокислот. Меньший размер белка NS3 в ранних изолятах вируса можно объяснить единственной нуклеотидной заменой

L80	MLFAQNYSLSSVCVSLQLQSTILFLQTSDLIVPAISRFCFGVSGGLPFSLLLQA									
PR8M										
PR8C		P								
FM		E	I			R		L	F	M V
FW		I		A		R		L	F	
USSR		I		A		R		L	F	
UD				A	S	R	F	A	L	F P
FPV	V		IY	L		I	S	L	F	G P

L80	NLRCRVSETRTVLSFHSSPPMRTPTAFLTSSAVCPGREGNGEISPTIAPSSVKALS									
PR8M										
PR8C										
FM		L				I		L		
FW		L	L			I		L		
USSR		L				I		L		
UD		L				I		I	K	
FPV	I					I		S		N

L80	NIRVSSRSKITLKFAPSMFSLMIAWSILIQRCPATFCLGMSMDQSLDISSRVMS									
PR8M										
PR8C									H	
FM		P		L					N	I
FW						I			N	I
USSR						I			N	I
UD			N				M S		I N	N I
FPV	SM			FP			M E		N	

L80	RXRDAGTEAMVILSASSDSSFRIRSTICFP <sup>*</sup> RVAVLMSRPRVLPPLRDF									
PR8M	X								S	
PR8C	X								S	
FM	X	E	A			L		T	S	F F
FW	Y	E	A			L		T	S	F
USSR	Y	E	A			L		TQ	S	F
UD	MY	E	V			F		TW	AS	F
FPV	X	V			S			T	S	

Рис. 3. Сравнение аминокислотных последовательностей гипотетического белка NS3 из разных штаммов: X/Ленинград/54/1 (L80), A/PR/8/34 вариант Mount Sinai (PR8M) и Cambridge (PR8C), A/FM/1/47 (FM), A/FW/1/50 (FW), A/USSR/77 (USSR), A/Udorn/72 (UD), A/FPV/Rostock/34 (FPV). Участки гомологичных доменов подчеркнуты. X соответствует терминирующему кодону в последовательности гена. Использован однобуквенный код (см. [1, 2])

Трипсин	CQGD <sup>*</sup> SGGP <sup>*</sup> VVCSGK <sup>*</sup> LQGI <sup>*</sup> VSWGSGC
NS3 FPV	CFGGSGGGPPFSLLLLQANLCIVSET
PR8	V L R
FM	M L V
UD	P

Рис. 4. Сравнение аминокислотных последовательностей каталитического центра трипсина и участка гипотетического белка NS3 штамма A/FPV/Rostock/34. Совпадающие аминокислотные остатки подчеркнуты. Звездочкой отмечен каталитически активный остаток серина. Ниже приведены аминокислотные замены в соответствующих белках штаммов A/PR/8/34 (PR8), A/FM/1/47 (FM) и A/Udorn/72 (UD)

T→A в штамме A/PR/8/34 [7, 8] и T→G в штамме A/FPV/Rostock/34 [10], приводящей к возникновению терминирующего кодона в C-концевом участке NS3.

Степень гомологии белков NS3 сравнима с гомологией белков NS1 и NS2 (рис. 3). Функция и само существование белка NS3 остаются гипотетическими, но продолжаются попытки его обнаружения [11]. Трансляция такого белка с вирионной цепи РНК должна осуществляться по необычному механизму, который до сих пор не обнаружен у вирусов с негативным геномом. Однако случайное появление во многих штаммах такой протяженной рамки трансляции мало вероятно (вероятность равна 0,00003 [11]).

Нами было обнаружено наличие в аминокислотной последовательности белка NS3 трех внутримолекулярных гомологичных доменов с консерва-

тивными остатками Cys и Gly, которые сохраняются у всех изученных штаммов вируса (см. рис. 3). Чтобы попытаться выяснить возможную функциональную роль белка NS3 в размножении вируса, мы сравнили структуру этих доменов со структурами некоторых клеточных белков, функции которых хорошо известны. Наибольшее совпадение было обнаружено с каталитическим центром сериновых протеиназ [14], в частности с трипсином (рис. 4).

На основании такой гомологии можно предположить, что белок NS3 мог бы обладать протеолитической активностью — например, прямо или косвенно, активируя клеточный фермент, участвовать в расщеплении геммагглютинаина на HA<sub>1</sub>- и HA<sub>2</sub>-субъединицы. Известно, что успех размножения вируса на том или ином хозяине существенно зависит от степени такого разрезания [15]. Описаны мутанты по гену белка NS, которые изменяют круг хозяев вируса [16]. И очень вероятно, что штаммы вируса типа А с широким спектром хозяев имеют возможность кодировать собственную трипсиноподобную протеиназу, в то время как у узкоспециализированного вируса гриппа типа В ее нет.

### Экспериментальная часть

В работе использовали вирус гриппа типа А Х/Ленинград/54/1 (H1N1-подтипа), являющийся рекомбинантом природного штамма А/Хабаровск/34457/77 и высокопродуктивного штамма А/PR/8/34, отобранным по антигенным свойствам природного штамма. Вакцинный штамм Х/Ленинград/54/1 — отечественного производства.

Подробное описание всех использованных в работе методов и реактивов приведено в наших работах [1, 2].

Авторы выражают признательность В. В. Старикову за предоставление препаративных количеств вируса гриппа, Ю. С. Скоблову за синтез меченых нуклеотидов высокой удельной активности, А. П. Донченко за обработку результатов на ЭВМ, С. Х. Дегтяреву за выделение высокоочищенных рестриктаз.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Беклемишев А. Б., Блинов В. М., Василенко С. К., Головин С. Я., Гуторов В. В., Каргинов В. А., Мамаев Л. В., Микрюков Н. Н., Негесов С. В., Петренко В. А., Петров Н. А., Сандахчиев Л. С. Биоорган. химия, 1984, т. 10, № 11, с. 1535–1543.
2. Беклемишев А. Б., Блинов В. М., Василенко С. К., Головин С. Я., Каргинов В. А., Мамаев Л. В., Микрюков Н. Н., Негесов С. В., Петренко В. А., Петров Н. А., Фролов И. В. Биоорган. химия, 1985, т. 11, № 5, с. 628–635.
3. Беклемишев А. Б., Блинов В. М., Василенко С. К., Головин С. Я., Каргинов В. А., Мамаев Л. В., Микрюков Н. Н., Негесов С. В., Петренко В. А., Петров Н. А., Фролов И. В. Биоорган. химия, 1985, т. 11, № 5, с. 636–640.
4. Maxam A. M., Gilbert W. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1977, v. 74, № 2, p. 560–564.
5. Kramer F. R., Mills D. R. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1978, v. 75, № 11, p. 5334–5338.
6. Lamb R. A., Lai C.-J. Cell, 1980, v. 21, № 1, p. 475–485.
7. Winter G., Fields S., Gait M. J., Brownlee G. G. Nucl. Acids Res., 1981, v. 9, № 2, p. 237–245.
8. Baez M., Taussing R., Zazra J. J., Young J. F., Palese P., Reisfield A., Skalka A. Nucl. Acids Res., 1980, v. 8, № 23, p. 5845–5858.
9. Krystal M., Buanagurio D., Young J. F., Palese P. J. Virol., 1983, v. 45, № 2, p. 547–554.
10. Porter A. G., Smith J. C., Emlage J. S. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1980, v. 77, № 9, p. 5074–5078.
11. Baez M., Zazra J. J., Elliott R. M., Young J. F., Palese P. Virology, 1981, v. 113, № 1, p. 397–402.
12. Briedis D. J., Lamb R. A. J. Virol., 1982, v. 4, № 1, p. 186–193.
13. Brown L. E., Hinshaw V. S., Webster R. G. Virology, 1983, v. 130, № 1, p. 134–143.
14. Geer J. J. Mol. Biol., 1981, v. 153, № 4, p. 1027–1042.
15. Rott R., Orlich M., Scholtissek C. Virology, 1983, v. 126, № 2, p. 459–465.
16. Maassab H. F., Deborde D. C. Virology, 1983, v. 130, № 2, p. 342–350.

Поступила в редакцию  
31.VII.1984  
После доработки:  
28.XI.1984

SYNTHESIS, CLONING AND SEQUENCING OF A FULL-LENGTH DNA COPY  
OF THE FRAGMENT 8 OF INFLUENZA VIRUS A GENOME

BEKLEMISHEV A. B., BLINOV V. M., VASSILENKO S. K., GOLOVIN S. Ya.,  
KARGINOV V. A., MAMAEV L. V., MIKRIUKOV N. N., NETESOV S. V.,  
PETRENKO V. A., PETROV N. A., PROLOV I. V.

*All-Union Research Institute of Molecular Biology,  
Koltzovo, Novosibirsk region*

Complete nucleotide sequence of the cloned full-length DNA copy of the influenza virus A (H1N1) RNA segment 8 has been determined. A section of the hypothetical protein coded for by the negative strand of the segment 8 is found to be homologous to the trypsin catalytic centre.