



УДК 577.113.5

ПОЛНОРАЗМЕРНАЯ ДНК-КОПИЯ ГЕНОМА ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА.

I. АНАЛИЗ 5'- И 3'-КОНЦЕВЫХ НЕКОДИРУЮЩИХ ОБЛАСТЕЙ ГЕНОМА

© 1995 г. Е. Ю. Добрикова, А. Г. Плетнев

Новосибирский институт биоорганической химии СО РАН,
630090, Новосибирск, просп. Лаврентьева, 8

Поступила в редакцию 10.05.94 г.

С помощью обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции получены фрагменты кДНК некодирующих участков генома вируса клещевого энцефалита (ВКЭ). Эти фрагменты клонированы в составе вектора рГЕМ3, определена их нуклеотидная последовательность и показана гетерогенность 3'-концевой нетранслируемой области РНК ВКЭ. С целью создания стабильной полноразмерной ДНК-копии генома ВКЭ в векторе на основе рBR322 клонированы 4 варианта кДНК вирусной РНК, различающиеся длиной и структурой 3'-концевой последовательности.

Ключевые слова: *Flaviviridae, полноразмерная ДНК-копия, некодирующая область генома, молекулярное клонирование, секвенирование.*

Вирус клещевого энцефалита, представитель семейства *Flaviviridae* [1], вызывает тяжелую нейроинфекцию с поражением центральной нервной системы и высоким (до 30%) уровнем смертности [2]. Вирус распространен в Сибири и на Дальнем Востоке России, а также в ряде стран Восточной и Западной Европы (Польша, Венгрия, Чехия, Словакия, Австрия). Природные штаммы ВКЭ, различающиеся по серологическим характеристикам и клиническим проявлениям, делятся на два подтипа: европейский и дальневосточный [3].

Геном ВКЭ состоит из одноцепочечной "плюс"-РНК длиной около 11000 н.о., которая содержит короткие нетранслируемые 5'- и 3'-области и единственную протяженную открытую рамку считывания и кодирует три структурных (С, М, Е) и семь неструктурных (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b, NS5) белков. Молекулярно-биологическое изучение флавивирусов сопряжено с рядом трудностей, которые обусловлены, с одной стороны, их патогенностью для человека, а с другой – низким уровнем продукции вирусных белков и нестабильностью геномной РНК.

В последние годы для некоторых флавивирусов были сконструированы полноразмерные ДНК-копии [4 - 6], что значительно облегчило их изучение.

В настоящей работе мы сообщаем о конструировании и клонировании полноразмерной ДНК-копии генома ВКЭ в векторе на основе рBR322.

Ранее в нашей лаборатории была определена полная нуклеотидная последовательность РНК дальневосточного подтипа ВКЭ (штамм Софьин) и получена библиотека кДНК, содержащая всю кодирующую область вирусного генома [7].

Фрагменты кДНК, соответствующие 5'-концевой последовательности генома, получали, используя вирусную РНК, выделенную из зараженных ВКЭ клеток почки эмбриона свиньи. В качестве праймеров применяли 5'-³²P-меченые дезоксирибоолигонуклеотиды Р1 или Р10, комплементарные участкам вирусной РНК в положениях 768 - 788 и 73 - 92 соответственно (таблица). Прямое секвенирование продуктов ОТ выявило последовательность (5')AGA UUUUCUUGC, идентичную первым 12 н.о. РНК штаммов Нург и Neudoerfl [8 - 10]. Сравнение нуклеотидных последовательностей РНК трех упомянутых штаммов ВКЭ показало, что их 5'-нетранслируемые и кодирующие области близки по структуре, которая согласуется с общими представлениями о строении РНК флавивирусов [11, 12].

В то же время структуры 3'-нетранслируемой области различаются у разных штаммов ВКЭ. Так, 3'-нетранслируемая область генома ВКЭ штамма Софьин (115 н.о.) [7] короче, чем у штамма Нург (461 н.о.), и в отличие от штамма Neudoerfl [10] не имеет poly(A)-тракта. Указанные различия в структуре и длине 3'-некодирующих областей у

Принятые сокращения: ВКЭ – вирус клещевого энцефалита, ОТ – обратная транскрипция, ПЦР – полимеразная цепная реакция, н.о. – нуклеотидный остаток.

Дезоксирибоолигонуклеотидные праймеры, использованные в обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции

Праймер	Структура (5' → 3')	Соответствие области генома (штамм Софьин)
P1	CCCCTTCCTGTGAGATCTCCC <i>Bgl</i> III	Комплементарен участку 768 - 788
P2	GGCGGGTCGGTACCAGCGGGTGTTTTTCCGAG <i>Kpn</i> I	Комплементарен 10741 - 10758
P3	AGATTTTCTTGCACGTGC	Гомологичен 1 - 18
P4	GGCGGGTCGGTACC(T) ₃₀ <i>Kpn</i> I	Комплементарен 3'-концу штамма NeudorfI
P5	GGATCCGGTACCTTCCCGGCCATCCCC <i>Kpn</i> I	Комплементарен 123 - 139
P6	CCTTTCAAAGCTTATGGGCAC <i>Hind</i> III	Гомологичен 9915 - 9936
P7	GGCGGGTCGGTACCGTTTAAAGTGCTCTTCAG <i>Kpn</i> I	Комплементарен 10460 - 10477
P8	GGCGGGTCGGTACC(T) ₃₀ GTTTAAAGTGCTCTTCAG <i>Kpn</i> I	P7 + oligo(T)-тракт
P10	CGTTCACGACTGATCAAGCG	Комплементарен 73 - 92

разных штаммов ВКЭ обусловили необходимость более подробного изучения 3'-концевой последовательности генома дальневосточного подтипа ВКЭ.

Для изучения структуры 3'-концевой области геномной РНК ВКЭ кДНК получали, используя вирусную РНК, выделенную из мозга зараженных мышей, по методу, предложенному С. Mandl [10]. 5'- и 3'-Концы вирусной РНК лигировали с помощью Т4-РНК-лигазы, после чего получали кДНК концевых участков генома методами ОТ и ПЦР (рис. 1), применяя олигонуклеотидные праймеры, выбранные на основании нуклеотидной последовательности штамма Софьин (таблица). В качестве праймера для синтеза первой цепи кДНК использовали олигонуклеотид Р5, содержащий сайт рестрикции *Kpn*I и последовательность, комплементарную 5'-концевому участку вирусной РНК в положениях 123 - 139. Двухцепочечные фрагменты кДНК получали с помощью ПЦР и пары праймеров - Р5 и Р6. Праймер Р6 гомологичен последовательности вирусной РНК в положениях 9915 - 9936 и содержит сайт для эндонуклеазы рестрикции *Hind*III (таблица).

Продукты ПЦР представляли собой гетерогенный набор фрагментов кДНК длиной 700 - 900 н.о. Амплифицированные фрагменты кДНК клонировали в векторе рGEM3 по сайтам рестрикции

*Kpn*I и *Hind*III. Рекombинантные плазмиды отбирали методом молекулярной гибридизации с ³²P-меченым ДНК-фрагментом клона р9 [7]. Была определена первичная структура ДНК 36 рекombинантных клонов, 11 из которых (3, 5 - 7, 10, 13 - 17, 34) содержали последовательность S* (рис. 2), 5 (5, 27, 29, 32, 35) имели точечные нуклеотидные замены, а остальные (1, 2, 8, 9, 11, 20, 25, 31, 33, 36) несли разные делеции по сравнению с S*. Ни один из проанализированных клонов не содержал протяженного poly(A)-тракта, его максимальная длина составляла 9 н.о. в положениях 10421 - 10430, причем он содержал остаток цитидина в положении 10426.

ДНК-клоны, содержащие индивидуальные 3'-концевые последовательности, были получены из очищенной через бляшки вирусной РНК. Для получения двухцепочечных фрагментов кДНК использовали пару праймеров - Р6 и Р2. В этом случае только 2 из 16 исследованных клонов содержали делеции: один в положениях 10388 - 10434, другой в положениях 10427 - 10572. Последовательность ДНК в остальных клонках была идентична S* или содержала точечные замены.

Чтобы проверить, имеется ли на 3'-конце вирусного генома штамма Софьин poly(A)-тракт, наличие которого показано для штамма NeudorfI [8],

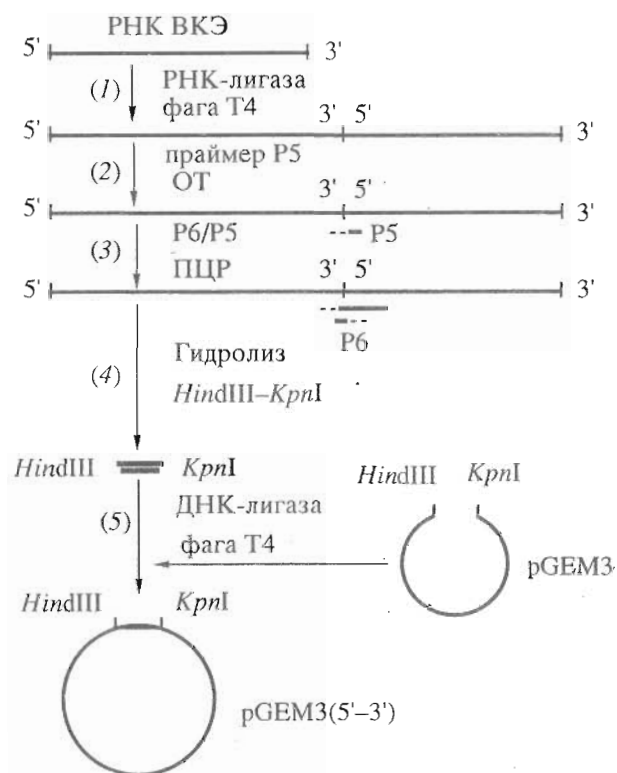


Рис. 1. Схема получения рекомбинантных плазмид, содержащих нетранслируемые области генома ВКЭ: (1) – лигирование 5'- и 3'-концов вирусной РНК; (2) – синтез кДНК; (3) – накопление двухцепочечного фрагмента кДНК; (4) – подготовка фрагмента кДНК к клонированию; (5) – клонирование фрагмента кДНК в векторе pGEM3.

РНК из очищенных вирионов или мозга зараженных мышей подвергали ОТ с помощью праймера P4. Последующая ПЦР с парой праймеров P6/P4 не приводила к накоплению ДНК, что служит дополнительным доказательством отсутствия протяженного poly(A)-тракта на 3'-конце вирусной РНК штамма Софьин.

Ни один из клонов, полученных на основе как очищенной вирионной РНК, так и РНК, выделенной из мозговой суспензии, не содержал последовательности, соответствующей последним 43 н.о. (положения 10435 - 10477, см. рис. 2), которая была определена ранее для штаммов Софьин и Neudoerfl [7, 8]. Эта последовательность представляет собой прямой несовершенный повтор и предшествует poly(A)-тракту в геноме Neudoerfl или завершает геном штамма Софьин, являясь частью короткой (115 н.о.) 3'-концевой области. Этот повтор отсутствует также и в последовательности штамма Нург. Чтобы проверить, имеется ли эта последовательность в популяции вирусной РНК, синтез кДНК проводили с использованием праймера P7, комплементарного 3'-концевой последовательности короткого варианта вирусного

генома, а амплификацию фрагментов – с помощью праймеров P6/P7. Секвенирование полученных клонов подтвердило наличие 3'-укороченного варианта геномной РНК.

Таким образом, результаты описанных выше экспериментов показывают, что популяция РНК ВКЭ содержит по крайней мере два пула молекул: с короткой (115 н.о.) и длинной (около 440 н.о.) 3'-нетранслируемой областью, причем пул с длинным 3'-концом состоит из гетерогенного набора молекул, содержащих различные делеции и точечные нуклеотидные замены. 3'-Концевая последовательность РНК штамма Нург и длинный 3'-конец (S*) штамма Софьин различаются на делецию в 65 н.о., соответствующую остаткам 10445 - 10511 в структуре штамма Нург, вставку остатка аденина между 10440-м и 10441-м остатками и делецию 10639-го остатка аденина в структуре РНК Нург. Остальная часть 3'-нетранслируемой области двух штаммов имеет гомологию 91.9%, причем последние 97 н.о. полностью идентичны для обоих штаммов.

Согласно общим представлениям об организации генома флавивирусов [12], размер 3'-концевой некодирующей области вирусной РНК варьирует от 400 до 600 н.о. и не имеет poly(A)-тракта. Структура длинного 3'-конца РНК ВКЭ соответствует этим представлениям. Как известно, 3'-концевая нетранслируемая область флавивирусных РНК содержит сигнальные последовательности для РНК-зависимых РНК полимераз [12]. Но при сравнении первичной структуры 3'-концевых областей некоторых флавивирусов (вируса Западного Нила, энцефалита Сент-Луис, японского энцефалита и вируса желтой лихорадки) заметной гомологии нуклеотидной последовательности обнаружить не удалось [13, 14]. Предполагается, что сигнальную функцию может выполнять высококонсервативная вторичная структура, в которую вовлечены последние 120 - 140 н.о. вирусной РНК. В то же время варибельность первичной структуры 3'-концевой области геномной РНК как по длине, так и по нуклеотидному составу, по-видимому, имеет значение для адаптации флавивирусной популяции к изменениям, происходящим в окружающей среде [14].

Нам показалось интересным исследовать влияние структуры 3'-концевой нетранслируемой области на инфекционность вирусной РНК. В последние годы разработаны методы, позволяющие получать вирусную РНК *in vitro*, используя в качестве матрицы полноразмерную ДНК-копию вирусного генома. Для конструирования полноразмерной ДНК-копии геномной РНК ВКЭ были использованы следующие варианты 3'-концевой последовательности: I (S) – соответствует короткому 3'-концу РНК штамма Софьин, II – получена из I введением poly(A)-тракта между последним

S	ACCGGCAUGACUUGCACUGGGAGUCCAAACUGGAGAGCUCAAUAAUCUAAAACCAGACUGUGA	10378
S*U.....	10378
NC.....C.....CU..G.....C.....	10390
HC.....C.....CU..G.....C.....	10390
<div style="display: flex; justify-content: space-around; width: 100%;"> ↗ 2 ↗ 3 ↖ 4 </div>		
S	CUGAGCAAAACCUGGAGUGCUCGUUAAACAUGUCCAGAACCAAAAACCACAGCAAGCAAUUC	10441
S*A..A..CAC.....	10434
NA.....C.....AG.....A.....G.....G.....GAA.....C.....	10452
HA.....C.....G.....A.....G.....G.....GAA.....C.....	10452
<div style="display: flex; justify-content: flex-end; width: 100%;"> ↖ 1, 2, 3 </div>		
S	ACAGAAAACAGAGCUCGAACUGAAGAGCUCUUUAAAC	10477
S*	-----CCCCC	10439
NG..U.....G.....G.....(A) _n	10488
HGUGUGAGACCCCCUGACCAGCAAAGGGGCAGAUCCGGUCAGGGGUGAGGGAUG.....	10515
S	*GGAGUGCCCUACGGCAACACGUCAAUGAGAGUGGGCGACGGGAACAUGGUCGACCCCGACGUAG	10502
HA.....AU.....G.....C.....G.....A.....U.....	10578
S	*GGCAUUCUGUUAAAACUUUGUGAGACCCCGGCACCAUGAUAAAGGCCGAACAUGGUGCAAG-AA	10564
HC.....AA.....U.....U.....U.....A.....	10641
S	*CGGGAGGCCCCCGGAAGCAUGCUUCCGGGAGGAGGGGAAGAGAGAAAUUGGCAACUCUCUUCGG	10627
HA.....U..C.....G.....A.....	10704
S	*GAUUUUUCCUCCUCCUAUACCAAAUCCCUUCAAUAGAGGGGGGGCGGUUCUUGUUCUCCCU	10690
HA.....C.....GG.....	10767
S	*GAGCCACCAUCACCCAGACACAGAUAGUCUGACAAGGAGGUGAUGUGUGACUCGGAAAAACAC	10753
H	10830
<div style="display: flex; justify-content: space-between; width: 100%;"> 10758 1 </div>		
S	-----AGAUUUUCUUGCACGUGCAUGCGUUUGCUCCCGGAUAGCAACAGCAGCGACAGGUUUG	57
S*	CCGCU.....	57
HG.....G.....U.....C.....UU.....GUU.....	57
<div style="display: flex; justify-content: space-between; width: 100%;"> 10835 1 </div>		
S	AGAGAGACAAUCUUUCGCUUG-AUCAGUCGUGAACGUGUUGAGAAAAAGACAGCUUAGGAGAA	119
S*	119
HA.....A..U..UU.....U..U..UU..C.....	107

Рис. 2. Сравнение нуклеотидных последовательностей нетранслируемых областей геномной РНК разных штаммов ВКЭ. S – продукты ПЦР, S* – нуклеотидная последовательность штамма Софийн, H – штамма Нург, N – штамма Neudoerfl. UAA – терминирующий кодон; ↗ 1... ↖ 1 – делеция, обнаруженная в последовательности продуктов ПЦР, клоны 2 и 11; ↗ 2... ↖ 2 – делеция в клонах 1, 8, 9, 20, 25, 31; ↗ 3... ↖ 3 – делеция в клоне 33; ↗ 4... ↖ 4 – делеция в клоне 36.

остатком цитидина в положении 10477 и КрпI-сайтом и является аналогом 3'-конца РНК штамма Neudoerfl, III (S*) – соответствует длинному 3'-концу генома ВКЭ, IV – имеет делецию размером 46 н.о. в положениях 10389 - 10434 по сравнению с III.

К настоящему времени для трех флавивирусов (вирусов желтой лихорадки, японского энцефалита и Денге 4) были сконструированы полноразмерные ДНК-копии, причем стабильную полноразмерную ДНК-копию в плазмидном векторе удалось получить только для вируса Денге 4 [6].

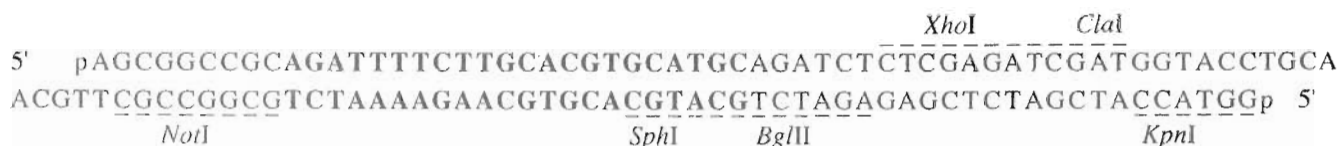


Рис. 3. Структура олигонуклеотидов, использованных для получения вектора рBR-332m. Выделены нуклеиновые остатки, входящие в состав генома ВКЭ. Штриховыми линиями отмечены сайты узнавания рестриктаз.

В двух других случаях (для вирусов желтой лихорадки и японского энцефалита) попытки получения полноразмерной ДНК-копии как в плазмидных векторах, так и в векторах на основе

бактериофага λ не были успешными из-за нестабильности рекомбинантных плазмид или их токсического действия на клетки *E. coli*. Геномы вирусов желтой лихорадки и японского энцефалита были клонированы в виде двух фрагментов, которые затем лигировали для получения полноразмерной ДНК-копии *in vitro* [4, 5]. Следует отметить, что проблема стабильности рекомбинантной плазмиды существовала и при сборке полноразмерной ДНК-копии вируса Денге 4, однако авторам удалось подобрать подходящий штамм клеток *E. coli* – BD1528 (*try A*, *met⁻*, *nadBF*, *unq⁻*, *gal⁻*, *supE*, *supF*, *nsdR⁻*, *hsdM⁺*) [6].

Для сборки полноразмерной ДНК-копии ВКЭ мы использовали вектор рBR322 и штамм *E. coli* BD1528. Два синтетических олигонуклеотида (рис. 3) клонировали по *PstI*-сайту рBR322. Модифицированный таким образом вектор рBR322-М содержал первые 22 н.о. вирусной последовательности (включая *SphI*-сайт) и последовательности для ферментов рестрикции *NotI*, *BglII*, *XhoI*, *Clal* и *KpnI*. Так как имеющаяся библиотека кДНК ВКЭ не включала в себя 5'-нетранслируемую область, фрагмент, содержащий первые 771 н.о., был получен в отдельном эксперименте с помощью ОТ вирусной РНК с праймера Р1 и амплификации с использованием пары праймеров Р1/Р3. Продукты ПЦР расщепляли рестриктазами *SphI* и *BglII* и клонировали в описанный выше модифицированный вектор рBR322-М. Рекомбинантные плазмиды (рBR322-М-5') с участком вирусного генома размером 771 н.о. отбирали по результатам секвенирования.

Вариант I полноразмерной ДНК-копии ВКЭ был получен серией последовательных клонирований фрагментов кДНК ВКЭ в составе вектора рBR322-М-5' согласно следующей стратегии:

- рBR322-М-5' *BglII*(771)–*KpnI*,
- р10 *BglII*(771)–*NcoI*(1490),
- р4 *NcoI*(1490)–*BamHI*(1982),
- р4 *BamHI*(1982)–*AvaII*(2352),
- р18 *AvaII*(2352)–*Cfr10I*(3132),
- р11 *Cfr10I*(3132)–*HindIII*(3672),
- р8 *HindIII*(3672)–*NcoI*(4185),
- р15 *NcoI*(4185)–*SacI*(4910),
- р6 *SacI*(4910)–*Sall*(5117),

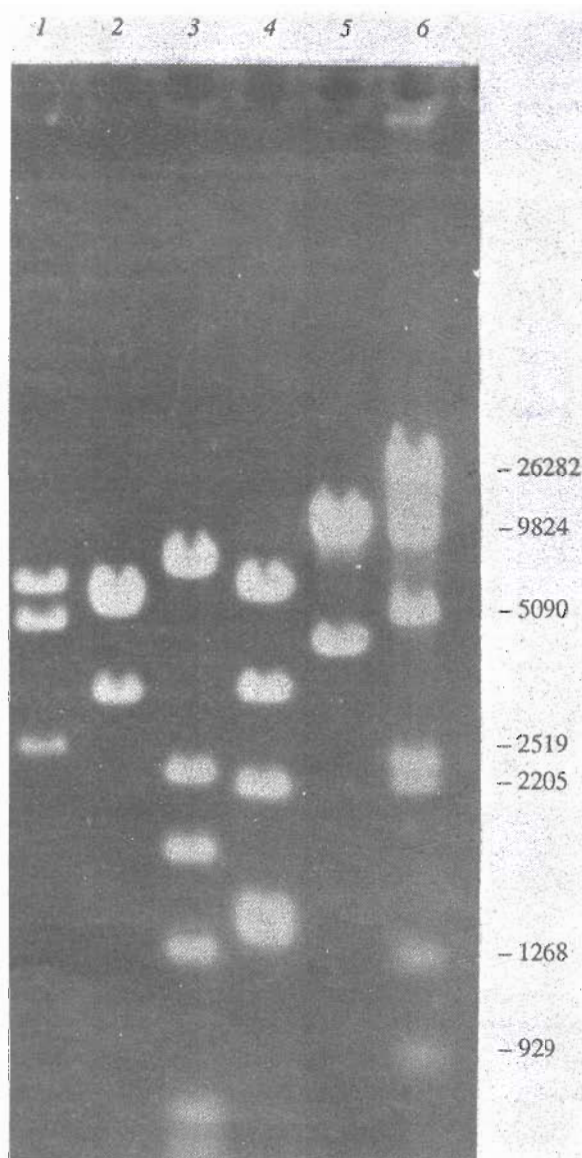


Рис. 4. Рестрикционный анализ рекомбинантной плазмиды, содержащей полноразмерную ДНК-копию ВКЭ, вариант I: 1 – *BamHI*; 2 – *BglII*; 3 – *NcoI*; 4 – *PstI*; 5 – *KpnI*–*NotI*; 6 – маркер для флага λ –*MluI*-гидролизат ДНК фага λ . Цифры справа – длина фрагментов ДНК (п. о.).

- p1 *SalI*(5117)–*XhoI*(5700),
 p223 *XhoI*(5700)–*BglII*(5956),
 p210 *BglII*(5956)–*Clal*(7000),
 p5 *Clal*(7000)–*PstI*(8257),
 p7 *PstI*(8257)–*BamHI*(8937),
 p13 *BamHI*(8937)–*Bpu14I*(9112),
 p17 *Bpu14I*(9112)–*HindIII*(9923),
 p9 *HindIII*(9923)–*KpnI*(10477).

KpnI-сайт во фрагмент клона p9 вводили амплификацией вирусной кДНК клона p9 с праймерами P6/P7.

Вариант II полноразмерной ДНК-копии получали заменой *HindIII*–*KpnI*-фрагмента плазмидной ДНК варианта I на соответствующий фрагмент, полученный в ПЦР с олигонуклеотидными праймерами P8/P6. В ДНК плазмид вариантов III и IV последний фрагмент *HindIII*–*KpnI* был заменен на фрагменты из рекомбинантных плазмид pGEM3-5'-3' – клоны 3 и 1 соответственно (см. выше). Структура всех плазмид, содержащих полноразмерную кДНК ВКЭ, была подтверждена рестрикционным анализом (рис. 4).

Создание полноразмерной ДНК-копии генома ВКЭ – необходимый этап дальнейшего молекулярно-биологического изучения вируса. По предварительным данным, после введения перед 5'-концом вирусного генома промотора SP6- или T7-ДНК-зависимой РНК-полимеразы полноразмерная ДНК-копия ВКЭ может служить матрицей для синтеза вирусной РНК *in vitro*. Этой части работы будет посвящено отдельное сообщение.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали агарозу, бромистый этидий, бромфеноловый синий, акриламид, сахарозу, ампициллин, тетрациклин (Sigma, США), додецилсульфат натрия, ксиленцианол (Serva, Германия), трис(оксиметиламино)метан, гидразингидрат, диметилсульфат, пиперидин, формамид (Мерск, Германия), термостабильную ДНК-полимеразу из *Thermus aquaticus*, фрагмент Кленова ("Биопол", Москва), термостабильную ДНК-полимеразу из *Thermus thermophilus*, эндонуклеазы рестрикции, ДНК- и РНК-лигазу фага T4, ревертазу ("Сибэнзим", Новосибирск), dNTP (Reanal, Венгрия), [α - 32 P]dNTP и [γ - 32 P]ATP (Санкт-Петербург), дезоксирибоолигонуклеотиды (НИБХ СО РАН, Новосибирск).

РНК ВКЭ выделяли из мозга зараженных мышей или монослая клеток почки эмбрионов свиньи методом фенольной депротенинизации и очищали центрифугированием в градиенте сахарозы (5 - 20%). Синтез первой цепи кДНК проводили по методу, описанному в работе [15], двухцепо-

чечные фрагменты кДНК получали методом ПЦР [16]. Клонирование кДНК, отбор рекомбинантных плазмид методом молекулярной гибридизации с ник-транслированными ДНК-фрагментами вирусного генома, выращивание рекомбинантных плазмид, выделение и очистка плазмидной ДНК описаны ранее [7]. Фрагменты кДНК секвенировали по методу Максама–Гилберта [17] с модификациями [18].

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 93-04-21067).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Calisher C.H., Karabatsos N., Dalrymple J.M., Shope R.E., Porterfield J.S., Westaway E.G., Brandt W.E. // J. Gen. Virol. 1989. V. 70. P. 37 - 43.
2. Shope R.E. // The Togaviruses / Ed. R.W. Schlesinger. N.Y.: Acad. Press, 1980. P. 47 - 82.
3. Clarke D.H. // Symposium on the Biology of Viruses of the Tick-Borne Encephalitis Complex / Ed. H. Libikova. N.Y.: Acad. Press, 1962. P. 67 - 75.
4. Rice C.M., Grakoui A., Galler R., Chambers T.J. // New Biol. 1989. V. 1. P. 285 - 296.
5. Sumiyoshi H., Hoke C.H., Trent D.W. // J. Virol. 1992. V. 66. P. 5425 - 5431.
6. Lai C.-J., Zhao B., Hori H., Bray M. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1991. V. 88. P. 5139 - 5143.
7. Pletnev A.G., Yamshchikov V.F., Blinov V.M. // Virology. 1990. V. 174. P. 250 - 263.
8. Mandl C.W., Heinz F.X., Kunz C. // Virology. 1988. V. 166. P. 197 - 205.
9. Mandl C.W., Heinz F.X., Stockl E., Kunz C. // Virology. 1989. V. 173. P. 291 - 301.
10. Mandl C.W., Heinz F.X., Kunz C. // J. Virol. 1991. V. 65. P. 4070 - 4077.
11. Brinton M.A., Dispoto J.H. // Virology. 1988. V. 162. P. 290 - 299.
12. Rice C.M., Lenches E.M., Eddy S.R., Shin S.J., Sheets R.L., Strauss J.H. // Science. 1985. V. 223. P. 726 - 733.
13. Takegami T., Washizu M., Yasui K. // Virology. 1986. V. 152. P. 483 - 486.
14. Brinton M.A., Fernandez A.A., Dispoto J.H. // Virology. 1986. V. 153. P. 113 - 121.
15. Маннатиус Т., Фрич Э., Сэмбрук Д. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984.
16. PCR Technology. Principles and Applications for DNA Amplification / Ed. H.A. Erlich, Stockton Press, 1989.
17. Maxam A., Gilbert W. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1977. V. 74. P. 560 - 564.
18. Чувпило С.А., Кравченко В.В. // Биоорган. химия. 1983. Т. 9. С. 1634 - 1637.

A Full-Size DNA Copy of the Tick-Borne Encephalitis Virus Genome. Part I. Analysis of Noncoding 5'- and 3'-Regions

E. Yu. Dobrikova and A. G. Pletnev

*Novosibirsk Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian Division, Russian Academy of Sciences,
pr. akademika Lavrent'eva 8, Novosibirsk, 630090 Russia*

Abstract – Using reverse transcription and the polymerase chain reaction, cDNA fragments of noncoding regions of the tick-borne encephalitis virus (TBEV) genome were obtained. These fragments were cloned into a pGEM3 vector, and their nucleotide sequences were determined. The heterogeneity of the 3'-terminal untranslated region of the TBEV RNA was revealed. To create a stable full-size DNA copy of the TBEV genome, four cDNA variants differing in length and structure of the 3'-terminal fragment of the viral RNA were cloned into a pBR322-derived vector.

Key words: Flaviviridae, full-size DNA copy, noncoding genome regions, molecular cloning, sequencing.