



ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 577.113.5

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ НУКЛЕОТИДОВ 3'-КОНЦА РНК ВИРУСА
ЭНЦЕФАЛОМИОКАРДИТА*Грачев С. А., Плетнев А. Г.**Новосибирский институт органической химии Сибирского отделения
Академии наук СССР**Василенко С. Е., Петров Н. А., Чижиков В. Е.**Всесоюзный научно-исследовательский институт молекулярной биологии
Главмикробиопрома, пос. Кольцово, Новосибирская обл.**Чумаков Ю. М.**Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,
Межфакультетская проблемная научно-исследовательская лаборатория
молекулярной биологии и биоорганической химии им. А. Н. Белозерского*

Вирус энцефаломиокардита мышей (ЭМК) относится к группе пикорнавирусов — РНК-содержащих вирусов животных. Его геном представлен одноцепочечной РНК длиной около 7700 нуклеотидов, которая содержит poly(A)-тракт на 3'-конце. РНК вируса кодирует, по-видимому, один гигантский полипептид, который по окончании трансляции расщепляется на структурные и неструктурные белки [1].

Для проведения ряда молекулярно-биологических исследований, связанных с использованием вируса ЭМК, необходимо знание полной нуклеотидной последовательности его РНК. Кроме того, РНК вируса ЭМК является удобным объектом для изучения комплементарно-адресованной модификации РНК с помощью синтетических олигонуклеотидов, несущих химически активные группы [2]. Выбор структуры такого олигонуклеотида определяется знанием первичной и вторичной структур модифицируемой РНК.

В настоящей работе проведено определение структуры 3'-концевой области РНК вируса ЭМК длиной 552 нуклеотида. Эта последовательность включает в себя как нетранслируемый участок (126 нуклеотидов), так и фрагмент, кодирующий С-концевую часть вирусной репликазы.

Для проведения клонирования была использована РНК вируса ЭМК, выделенная из очищенных вирионов с помощью фенольной экстракции и последующего центрифугирования в градиенте сахарозы. Комплементарную ДНК (кДНК) получали по модифицированному методу [3] с помощью обратной транскриптазы вируса птичьего миелобластома, используя 5 мкг вирусной РНК и 4 мкг (dT)₁₃₋₁₈ в качестве затравки, в присутствии ингибитора РНКазы А из плаценты человека (50 мг/мл). РНК вируса ЭМК разрушали кипячением в присутствии 10 мкг/мл РНКазы А. Двухцепочечную кДНК (дкДНК) синтезировали без затравки, используя ДНК-полимеразу I *E. coli* (фрагмент Кленова, КФ 2.7.7.7) с последующей обработкой нуклеазой S1 из *Aspergillus oryzae* (КФ 3.1.30.1). Фракцию высокомолекулярной дкДНК отделяли гель-фильтрацией на колонке с сепарозой 4В.

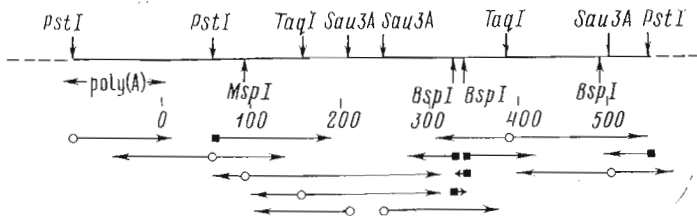


Рис. 1. Стратегия секвенирования ДНК из 4-го клона. ■ — 5'-³²P-меченные фрагменты ДНК (с помощью T4-полунуклеотидкиназы и [γ -³²P]ATP); ○ — 3'-³²P-меченные фрагменты ДНК (с помощью [α -³²P]dNTP и ДНК-полимеразы A *E. coli*)

Lys Asn Phe Glu Phe Asp Asp Val Lys Val Leu Ser Tyr Gly Asp
 AAA AAU UUU GAA UUU GAU GAU GUG AAG GUG UUG UCG UAC GGA GAU
 Asp Leu Leu Val Ala Thr Asn Tyr Gln Leu Asp Phe Asp Lys Val
 GAU CUC CUU GUG GCC ACA AAU UAC CAA UUG GAU UUU GAU AAG GUG
 500
 Arg Ala Ser Leu Ala Lys Thr Gly Tyr Lys Ile Thr Pro Ala Asn
 AGA GCA AGC CUC GCA AAG ACA GGA UAU AAG AUA ACU CCC GCU AAC
 Lys Thr Ser Thr Phe Pro Leu Asn Ser Thr Leu Glu Asp Val Val
 AAA ACU UCU ACC UUU CCU CUU AAU UCG ACG CUU GAA GAC GUU GUC
 400
 Phe Leu Lys Arg Lys Phe Lys Lys Glu Gly Pro Leu Tyr Arg Pro
 UUC UUA AAA AGA AAG UUU AAG AAA GAG GGC CCU CUG UAU CGG CCU
 Val Met Asn Arg Glu Ala Leu Glu Ala Met Leu Ser Tyr Tyr Arg
 GUC AUG AAC AGA GAG GCG UUG GAA GCA AUG UUG UCA UAC UAU CGU
 300
 Pro Gly Thr Leu Ser Glu Lys Leu Thr Ser Ile Thr Met Leu Ala
 CCA GGG ACU CUA UCU GAG AAA CUC ACU UCG AUC ACU AUG CUU GCC
 Val His Ser Gly Lys Gln Glu Tyr Asp Arg Leu Phe Ala Pro Phe
 GUU CAU UCU GGC AAG CAG GAA UAU GAU CGG CUC UUU GCC CCA UUC
 200
 Arg Glu Val Gly Val Val Val Pro Ser Phe Glu Ser Val Glu Tyr
 CGU GAG GUA GGG GUU GUC GUG CCA UCA UUC GAG AGU GUG GAG UAC
 Arg Trp Arg Ser Leu Phe Trp
 AGA UGG AGG AGU CUG UUC UGG UAG UAG UGCAGUCACUGGCACAACGCCGUU
 100
 ACCCGGUAAGCCAAUCGGGUUAUACACGGUCGUCAUACUGCAGACAGGGUUCUUCUACUU
 UGCAAGAUAGUCUAGAGUAGUAAAAUAAUAGAUAGAGAAAAA.....

Рис. 2. Структура 3'-концевого фрагмента РНК вируса ЭМК и строение С-концевой области вирусной репликазы (белок Е), определенные при секвенировании 4-го клона. Подчеркнуты нуклеотидные остатки, отличающиеся от приведенных в работе [10], где установлена последовательность 420 нуклеотидов с 3'-конца РНК вируса ЭМК

В качестве вектора использовали ДНК плазмы pBR 322. Для этого плазмидную ДНК разрезали рестриктазой *PstI* (КФ 3.1.23.31), образовавшиеся при этом 3'-выступающие концы наращивали oligo(dG)-трактами (10–15 нуклеотидов), используя терминальную дезоксицидидилтрансферазу из тимуса телят (КФ 2.7.7.31). Аналогичным образом на концы дкДНК наращивали 15–20 остатков дезоксицитидиловой кислоты. Векторную и клонируемую ДНК подвергали совместному отжигу в буфе-

ре, содержащем 100 мМ NaCl, 10 мМ трис-HCl (pH 8,0), 0,25 мМ EDTA (5 мин при 65° С, затем 3 ч при 44° С). Полученными рекомбинантными ДНК трансформировали клетки *E. coli* HB101 по методу [4].

После отбора клонов с фенотипом *Tc^rAp^s* дальнейшему анализу подвергались 96 клонов. На первом этапе проводили гибридизацию клонов [5] с ³²P-меченым неполным гидролизатом РНК вируса ЭМК, для получения которого эту РНК обрабатывали 1 М пиперидином в течение 15 мин при 20° С, фрагменты РНК осаждали спиртом и метили с помощью Т4-полинуклеотидкиназы (КФ 2.7.1.78) и [γ -³²P]АТР. Наиболее интенсивно гибридизующимися оказались три клон, при рестрикционном анализе которых было найдено, что два из них практически идентичны и их плазмидная ДНК содержит уникальный сайт расщепления рестриктазой *Pst*I. Плазмидная ДНК из третьего клона под действием рестриктазы *Pst*I расщепляется с образованием фрагмента длиной около 1200 пар оснований. В то же время в работах [6, 7], где была определена последовательность 120 и 170 нуклеотидов с 3'-конца РНК вируса ЭМК, было установлено, что на расстоянии 56 нуклеотидов от poly(A)-конца РНК есть последовательность C-U-G-C-A-G, соответствующая *Pst*I-сайту. Поэтому для структурного анализа нами была выбрана ДНК еще одного, четвертого, менее интенсивно гибридизующегося клон, разрезаемая рестриктазой *Pst*I на три фрагмента. Определение нуклеотидной последовательности клонированного фрагмента ДНК проводили по модифицированному [8] методу [9]. Стратегия определения структуры ДНК приведена на рис. 1, а последовательность нуклеотидов 3'-конца РНК вируса ЭМК, выведенная на основании результатов секвенирования, — на рис. 2. Эти данные подтверждены анализом других клонов, полученных нами позже.

Авторы признательны Г. П. Георгиеву и П. М. Чумакову (ИМБ АН СССР) за возможность проведения работы по клонированию в их лаборатории.

ЛИТЕРАТУРА

1. Agol V. I., Chumakov K. M., Dmitrieva T. M., Svitkin Yu. V. In: Biology reviews/Ed. Skulachev V. P. Soviet scientific reviews/section D, Harwood Acad. Publ., GMBH, Chur, 1980, v. 1, p. 319–370.
2. Гринева И. И., Карнова Г. Г. Молекулярн. биология, 1974, т. 8, № 6, с. 832–844.
3. Liebscher D. H., Coutelle C., Rappoport T. A., Hahn V., Rosentahl S., Prehn S., Williamson R. Gene, 1980, v. 9, № 3/4, p. 233–246.
4. Hershfeld V., Boyer H. V., Yanofsky C., Lovett M. A., Helinsky D. R. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1974, v. 71, № 9, p. 3455–3459.
5. Grunstein M., Hogness D. S. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1975, v. 72, № 7, p. 3961–3965.
6. Zimmer D., Kaesberg P. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1978, v. 75, № 9, p. 4257–4261.
7. Porter A. G., Merregaert J., Van Emmelo J., Fiers W. Eur. J. Biochem., 1978, v. 87, № 3, p. 551–561.
8. Коробко В. Г., Грачев С. А., Колосов М. Н. Биооргани. химия, 1978, т. 3, № 7, с. 1281–1283.
9. Maxam A. M., Gilbert W. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1977, v. 74, № 2, p. 560–564.
10. Drake N. L., Palmenberg A. C., Grosh A., Omilianowski D. R., Kaesberg P. J. Virol., 1982, v. 41, № 2, p. 726–729.

Поступило в редакцию
7.II.1983

NUCLEOTIDE SEQUENCE OF THE 3'-TERMINUS OF ENCEPHALOMYOCARDITIS VIRUS RNA

GRACHEV S. A., PLETNEV A. G., VASSILENKO S. K., PETROV N. A.
CHIZHIKOV V. E., CHUMAKOV K. M.

Novosibirsk Institute of Organic Chemistry, Siberian Branch of the Academy of Sciences of the USSR; All-Union Research Institute of Molecular Biology, Koltsovo, Novosibirsk Region; A. N. Belozersky Laboratory of Molecular Biology and Bioorganic Chemistry, M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow

Reverse transcription afforded DNA-copies of the 3'-terminal sequence of mouse encephalomyocarditis virus RNA. Cloning of this cDNA in pBR 322 plasmid and sequencing of DNA of one of the clones established the structure (552 nucleotide residues) of the 3'-terminus of viral RNA. This region contains a non-translatable fragment (126 nucleotides) and also the fragment coding for the C-terminus of viral replicase.