



УДК 578.832.1А:577.113.5:577.215

**СИНТЕЗ ПОЛНОРАЗМЕРНОЙ ДНК-КОПИИ ГЕНА  
ГЕМАГГЛЮТИНИНА ВИРУСА ГРИППА А Н1Н1-ПОДТИПА,  
ЕЕ КЛОНИРОВАНИЕ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПЕРВИЧНОЙ СТРУКТУРЫ**

*Беклемишев А. Б., Блинов В. М., Василенко С. К.,  
Головин С. Я., Гуторов В. В., Каргинов В. А.,  
Мамаев Л. В., Микрюков Н. Н., Петесов С. В.,  
Петренко В. А., Петров Н. А., Сандахицев Л. С.*

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

На матрице РНК вируса гриппа А (Н1Н1-подтипа) синтезирована двухцепочечная кДНК, которая затем клонирована в *E. coli* в составе плазмиды рВР327. Получены клоны, содержащие полноразмерные ДНК-копии гена гемагглютинина. Методом Максама – Гилберта определена полная нуклеотидная последовательность этой ДНК-копии. Проведено ее сравнение со структурами аналогичных генов родственных штаммов вируса гриппа.

Грипп — одно из наиболее распространенных заболеваний человека и животных. Одной из проблем вакцинопрофилактики этой инфекции являются постоянные изменения антигенных свойств поверхностных белков вириона гриппа, которые обусловлены изменениями в геноме. Изучение закономерностей эволюции антигенных детерминант вируса гриппа может помочь в прогнозировании будущих антигенных изменений поверхностных белков и создании специфических средств профилактики этой инфекции.

Методы обратной транскрипции вирусной РНК, клонирования копийной ДНК (кДНК) и определения первичной структуры ДНК позволяют максимально быстро получать информацию о первичной структуре белков, кодируемых этими РНК. За последние годы опубликовано несколько десятков работ по клонированию ДНК-копий различных фрагментов генома вируса гриппа типа А и определению их первичной структуры; значительная часть этих работ посвящена клонированию ДНК-копий гена гемагглютинаина [1]. В результате удалось проследить некоторые эволюционные закономерности для генов гемагглютининов подтипа Н3 [2]; появилась также работа группы Браунли [3], положившая начало исследованиям по эволюции гена гемагглютинаина подтипа Н1. В связи с большой значимостью исследований по эволюции генов гемагглютининов, а также с целью создания молекулярной противогриппозной вакцины нами была поставлена задача по клонированию и определению первичной структуры ДНК-копии гена гемагглютинаина вируса гриппа мало исследованного ранее штамма А/Хабаровск/7/77.

Вирусную РНК из препарата вируса, свежееочищенного центрифугированием в градиенте плотности сахарозы [4], выделяли по модифицированному нами методу [5]. Синтез первой и второй цепей кДНК проводили с использованием специфических олигонуклеотидов-затравок, один из которых — d(A-G-C-A-A-A-A-G-C-A-G-G) — комплементарен 3'-концевому участку вирусной РНК, а второй — d(A-G-T-A-G-A-A-A-C-A-A-G-G) — 3'-концевому участку полноразмерной одноцепочечной кДНК [6, 7]. Олигонуклеотиды были синтезированы модифицированным триэфирным методом [8] и очищены последовательно ионообменной и обращенно-фазовой хроматографией.

Синтезированную двухцепочечную кДНК снабдили oligo(dC)-коннекторами с помощью концевой дезоксирибонуклеотидилтрансферазы и подвергли электрофорезу в 3% полиакриламидном геле параллельно с маркерами

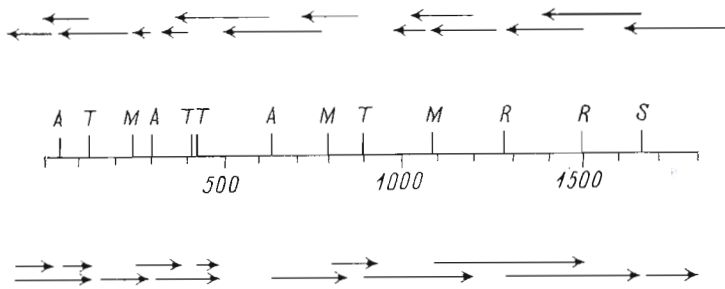


Рис. 1. Стратегия определения нуклеотидной последовательности гена гемагглютина. Буквами обозначены сайты рестрикции соответствующих рестриктаз: А — *Ava*II, Т — *Taq*I, М — *Msp*I, R — *Eco*RI, S — *Sau*3A

молекулярной массы — *bsp*I-гидролизатом ДНК фага Т7 [9]. Область геля, содержащая ДНК с размерами от 1400 до 2000 нуклеотидных пар, была вырезана и кДНК выделена посредством электроолюции. Полученную двухцепочечную кДНК отжигали с вектором ДНК плазмиды pBR327 [10], предварительно обработанной рестриктазой *Pst*I и затем концевой дезокси-синуклеотидилтрансферазой в присутствии рppdG. После трансформации полученной смесью штамма *E. coli* JC5183 отбирали колонии с фенотипом  $Ar^sTc^r$ , которые далее анализировали методом гибридизации *in situ* с  $^{32}P$ -мечеными фрагментами РНК гена гемагглютина, выделенной из геля после электрофореза. Из гибридизующихся клонов выделяли плазмидные ДНК, размер вставок в которых определяли с помощью гидролиза рестриктазой *Pst*I. Для анализа первичной структуры были взяты три гибридные плазмиды, две из которых, как оказалось, содержали фрагменты, соответствующие полной копии гена гемагглютина, а одна — участку этого же гена длиной 1206 нуклеотидных пар. Это было сделано, чтобы исключить вероятность случайного отбора минорного варианта гена в случае гетерогенности популяции вируса, всегда имеющей место ввиду лабораторного дрейфа.

Далее были получены рестриктные карты клонированных фрагментов и выбрана стратегия определения их первичной структуры (рис. 1). Для установления первичной структуры плазмидные ДНК гидролизовали рестриктазами, полученные фрагменты выделяли, метили «заполнением» липких концов ДНК-полимеразой I в присутствии соответствующих дезокси-нуклеозид-5'-[ $\alpha$ - $^{32}P$ ] трифосфатов [11] и затем подвергали повторному расщеплению рестриктазами или разделению цепей. В результате получали меченные только с одного конца молекулы, которые далее использовали для секвенирования методом Максама — Гилберта [11, 12]. Более 90% последовательности было проанализировано по обоим цепям ДНК, причем большей частью параллельно для двух-трех независимых клонов. Ни в одном случае не было обнаружено различий между клонами. Это позволяет утверждать, что определенная нами структура широко распространена в популяции вируса этого штамма, а не является случайным минорным вариантом гена, что нельзя исключить для большинства предшествующих работ по определению нуклеотидных последовательностей генов вируса гриппа [1]. Установленная нами полная нуклеотидная последовательность гена гемагглютина вируса гриппа А/Хабаровск/7/77 приведена на рис. 2 в сравнении со структурой аналогичного гена штамма А/PR/8/34 [13].

Известно, что различные области гена гемагглютина вируса гриппа имеют различную функциональную и антигенную значимость [1]. Наиболее изменчивая часть гена — область, которая кодирует  $HA_1$ -субъединицу, несущую основные антигенные детерминанты. В недавней работе группы Браунли [14] приведены данные о первичной структуре  $HA_1$ -субъединицы пяти различных штаммов вируса гриппа А Н1-подтипа. После детального анализа различий между последовательностями этих штаммов и структурой  $HA_1$ -субъединицы штамма А/Хабаровск/7/77 нами был сделан вывод, что штаммы А/Хабаровск/7/77 и А/СССР/90/77 являются наиболее близкородственными: в  $HA_1$ -области между ними имеются лишь три аминокис-

лотных различия, два из которых (№ 81, 171) локализованы в районе антигенных детерминант соответственно  $S_a$  и  $S_a/S_b$ . Это подтверждает результаты более ранней работы группы Браунли [3] по картированию антигенных детерминант вируса гриппа А подтипа H1N1 с помощью моноклональных антител. Интересно, что третье различие между указанными выше структурами ( $Ser^{73} \rightarrow Asp^{73}$ ) отмечено вдали от картированных в работе [3] детерминант, однако такая же замена имеется и в других штаммах H1-подтипа: Braz/78, Eng/80, Ind/80 [14]. По данным Накаджимы и др., приведенным в работе [14], их вариант штамма A/СССР/90/77 имеет замену в 171-м положении ( $Glu^{171} \rightarrow Lys^{171}$ ), что делает его еще более близким к варианту A/Хабаровск/7/77.

Что касается других областей гена гемагглютинаина, то их структуру можно сравнить лишь со структурой аналогичных областей этого гена штамма A/PR/8/34 [13]. В табл. 1 и 2 приведены соответственно нуклеотидные различия по различным областям гена гемагглютинаинов штамма A/PR/8/34 и A/Хабаровск/7/77 и аминокислотные различия гемагглютининов этих штаммов.

С-Концевая область гена гемагглютинаина, кодирующая  $HA_2$ -субъединицу [1], более консервативна, что подтвердилось и для случая штамма A/Хабаровск/7/77. По сравнению с  $HA_2$ -областью гена гемагглютинаина штамма A/PR/8/34 имеется 31 нуклеотидная замена, причем 24 из них приходится на третье положение в кодонах и не приводят к замене аминокислот (см. рис. 2 и табл. 1). Нуклеотидные замены в других положениях приводят к семи аминокислотным заменам, пять из которых гомологичны ( $Asn^{415} \rightarrow Asp^{415}$ ,  $Asp^{489} \rightarrow Asn^{489}$ ,  $Lys^{497} \rightarrow Arg^{497}$ ,  $Ile^{517} \rightarrow Val^{517}$ ,  $Val^{527} \rightarrow Ile^{527}$ ) и поэтому не могут существенно изменить конформацию и свойства молекулы  $HA_2$ -субъединицы. Две же другие замены ( $Glu^{416} \rightarrow Lys^{416}$  и  $Tyr^{405} \rightarrow Ile^{405}$ ) могут оказать существенное влияние на конформацию полипептидной цепи.

В потенциальных сайтах гликозилирования  $HA_1$ -субъединицы штамма A/Хабаровск/7/77 никаких различий по сравнению со штаммом A/СССР/90/77 обнаружено не было. Не оказалось различий в потенциальных сайтах гликозилирования  $HA_2$ -субъединицы между штаммами A/Хабаровск/7/77 и A/PR/8/34. При сравнении нуклеотидных последовательностей этих же штаммов не обнаружено делеций или вставок в кодирующей области. Однако в некодирующей 3'-концевой части гена гемагглютинаина имеется вставка, которая удлиняет *oligo(A)*-область гена на один нуклеотид. Подобного изменения в первичной структуре гена гемагглютинаина не было обнаружено ранее ни у одного штамма вируса гриппа типа А.

### Экспериментальная часть

В работе был использован рекомбинант штаммов A/Хабаровск/7/77 и A/PR/8/34, отобранный по антигенным свойствам штамма A/Хабаровск/7/77 под названием X/Ленинград/54/1, разрешенный к применению в качестве инактивированной вакцины против вируса гриппа Минздравом СССР. Штамм был получен из лаборатории биохимии Омутнинского химического завода (г. Омутнинск Кировской обл.).

Акриламид, бисакриламид, 2-меркаптоэтанол, трисоксиметиламиноэтан, дезоксирибонуклеозид-5'-трифосфаты, EDTA, бычий сывороточный альбумин, рибонуклеаза А, дрожжевой экстракт, пептон, агар, протеиназа К — препараты фирмы Serva (ФРГ); агароза — фирмы Bio-Rad (США); тетрациклин, ампициллин, левомецетин (хлорамфеникол) — производства СССР (без наполнителя); дезоксирибонуклеозид-5'-[ $\alpha^{32}$ -P] трифосфаты — отечественного производства.

Обратная транскриптаза из вируса миелобластома птиц предоставлена В. М. Кавсаном (ИМБГ АН УССР, Киев). ДНК-полимераза I (фрагмент Кленова) из *E. coli*, концевая дезоксирибонуклеотидилтрансфераза из тимуса теленка, рестриктазы *Bam*HI, *Bsp*RI — производства НИКТИ БАН (г. Бердск Новосибирской обл.). Рестриктазы *Msp*I, *Taq*I, *Taq*XI, *Mva*I —

Met Lys Ala Asn  
 Leu Leu Val Leu Leu  
 AG CAA AAG CAG GGG AAA ATA AAA ACA ACC AAA ATG AAA GCA AAA CTA CTG GTC CTG TTA  
 G C  
 59

Ala Ala  
 Cys Ala Leu Ser Ala Thr Asp Ala Asp Thr Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser  
 TGT GCA CTT TCA GCT ACA GAT GCA GAC ACA ATA TGT ATA GGC TAC CAT GCG AAC AAC TCA  
 G G T  
 119

Thr Asp Thr Val Asp Thr Val Leu Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ser Val Asn Leu  
 ACC GAC ACT GTT GAC ACA GTA CTC GAA AAG AAC GTG ACA GTG ACA CAC TCT GTC AAC CTA  
 G T  
 179

Leu Glu Asp Ser His Asn Gly Lys Leu Cys Arg Leu Lys Gly Ile Ala Pro Leu Gln Leu  
 CTT GAG GAC AGT CAC AAC GGA AAA CTA TGC AGA CTA AAA GGA ATA GCC CCA CTA CAA TTG  
 C A C T T  
 239

Gly Lys Cys Lys Ser Ile Ala Gly Trp Ile Leu Gly Asn Pro Glu Cys Asp Pro Leu Pro  
 GGG AAA TGC AGC ATT GCC GGA TGG ATC TTA GGA AAC CCA GAA TGC GAA TCA CTG GTT TCT  
 T A C C C G G A A C C A G A C C C C C C C A  
 299

Val Arg  
 Lys Lys Ser Trp Ser Tyr Ile Val Glu Thr Pro Asn Ser Glu Asn Gly Ile Cys Tyr Pro  
 AAG AAA TCA TGG TCC TAC ATT GCA GAA ACA CCA AAC TCC GAG AAT GGA ACA TGT TAC CCA  
 GT G T T T T  
 359

Asp Ile  
 Gly Tyr Phe Ala Asp Tyr Glu Glu Leu Arg Glu Gln Leu Ser Ser Val Ser Ser Phe Glu  
 GGA TAT TTC GCC GAC TAT GAG GAA TTG AGG GAG CAA TTG AGC TCA GTA TCA TCA TTC GAG  
 G AT G C  
 419

Arg Phe Glu Ile Phe Pro Lys Glu Arg Ser Trp Pro Asn His Asn Thr Lys  
 AGA TTC GAA ATA TTC CCC AAG GAA AGA TCA TGG CCC AAC CAC AAC Val Thr Arg Gly Val  
 T A C C C A C C C C A C A C A A A A A A A A  
 479

Thr Ala Ser Cys Ser His Ala Lys Gly Lys Ser Ser Phe Tyr Arg Asn Leu Leu Trp Leu Thr  
 ACG GCA TCA TGC TCC CAT AAG GGG AAA AGC AGT TTT TAC AGA AAT TTG CTA TGG CTG ACG  
 G GC GC  
 539

Glu Lys Asn Gly Ser Tyr Pro Asn Leu Ser Lys Ser Tyr Val Asn Asn Lys Gly  
 GAG AAA AAT GGC TCG TAC CCA AAT CTG AGC AAG TCC TAT GTG AAC AAC AAA GAG AAA GAG  
 G G G A A A A A A A A A A A A A A A A A A A  
 599

Val Leu Val Leu Trp Gly Ile Val His His Pro Ser Asn Ile Glu Asp Gln Lys Thr Ile Tyr  
 GTC CTT GTA CTA TGG GGT GTT CAT CAC CCG TCT AAC ATA GAG GAC CAA AAG ACC ATC TAT  
 G A  
 659

Gln Asn  
 Arg Lys Glu Asn Ala Tyr Val Ser Val Val Ser Ser Asn Tyr Asn Arg Arg Phe Thr Pro  
 CCG AAA GAA AAT GCT TAT GTC TCT GTA GTG TCT TCA AAT TAT AAC AGG AGA TTC ACC CCA  
 A T A  
 719

Glu Ile Ala Glu Arg Pro Lys Val Arg Gly Gln Ala Gly Arg Ile Asn Tyr Tyr Trp Thr  
 GAA ATA GCA GAA AGA CCC AAA GTA AGA GGT CAA GCA GCG AGA ATT AAC TAC TAC TGG ACT  
 A T A  
 779

Lys  
 Leu Leu Glu Pro Gly Asp Thr Ile Ile Phe Glu Ala Asn Gly Asn Leu Ile Ala Pro Arg  
 CTG CTG GAA CCG GGC GAC ACA ATA ATA TTT GAG GCA AAT GGA AAT CTA ATA GCG CCA TGG  
 T A  
 839

Tyr  
 His Ala Phe Ala Leu Ser Arg Gly Phe Gly Ser Gly Ile Ile Thr Ser Asn Ala Ser Met  
 CAT GCT TTC GCA CTG AAT AGA GGC TTT GGG TCA GGA ATC ATC ACC TCA AAC GCA TCG ATG  
 T G G A  
 899

His Asp Glu Cys\* Asn  
GAT GAA TGT GAC ACG AAG TGT CAA ACA CCC CAG GGA GCT ATA AAC AGT AGT Ser Leu Pro Phe  
C G A T T  
959

Gln Asn Ile His Pro Val Thr Ile Gly Glu Cys\* Pro Lys Tyr Val Arg Ser Thr Lys Leu  
CAG AAT ATA CAC CCA GTC ACA ATA GGG GAG TGC CCA AAA TAC GTC AGG AGT ACA AAA TTG  
A G C  
1019

Arg Met Val Thr Gly Leu Arg Asn Ile Pro Ser Ile Gln Ser Arg Gly Leu Phe Gly Ala  
AGG ATG GTT ACA GGA CTA AGG AAC ATC CCA TCC ATT CAA TCC AGA GGT CTG TTT GGA GCC  
T G A  
1079

Ile Ala Gly Phe Ile Glu Gly Gly Trp Thr Gly Met Ile Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr His  
ATT GCC GGT TTC ATT GAA GGG GGA TGG ACT GGA ATG ATA GAT GGA TGG TAT GGT TAT CAT  
T C  
1139

His Gln Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Gln Lys Ser Thr Gln Asn Ala Ile  
CAT CAG AAT GAA CAG GGA TCT GGC TAT GCT GCG GAT CAA AAA AGC ACA CAA AAT GCC ATT  
A A  
1199

Asn Gly Ile Thr Asn Lys Val Asn Ser Val Ile Glu Lys Met Asn Thr Gln Phe Thr Ala  
AAC GGG ATT ACA AAC AAG GTG AAC TCT GTT ATC GAG AAA ATG AAC ACT CAA TTC ACA GCT  
T  
1259

Val Gly Lys Glu Phe Asn Lys Val Asn Ser Val Ile Glu Lys Arg Met Glu Asn Leu Asn Lys Lys Val Asp  
GTG GGT AAA GAA TTC GAC GAA TTA GAA AAA AGG ATG GAA AAC TTA AAT AAA AAA GTT GAT  
A A T  
1319

Asp Gly Phe Leu Asp Ile Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Leu Glu Asn Glu  
GAT GGA TTT CTG GAC ATT TGG ACA TAT AAT GCA GAA TTG TTG GTT CTA CTG GAA AAT GAA  
A  
1379

Arg Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu Tyr Glu Lys Val Lys Ser Gln  
AGG ACT TTG GAT TTT CAT GAC TCA AAT GTG AAG AAT CTG TAT GAG AAA GTA AAA AGC CAA  
C C  
1439

Leu Lys Asn Asn Ala Lys Glu Ile Gly Asn Gly Cys\* Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys\* Asp  
TTA AAG AAT AAT GCC AAA GAA ATA GGA AAC GGG TGT TTT GAA TTC TAC CAC AAG TGT  
C A T A G  
1499

Asn Glu Cys\* Met Glu Ser Val Lys Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Lys Tyr Ser Glu Glu  
AAT GAA TGC ATG GAA AGT GTA AAA AAT GGA ACT TAT GAC TAT CCA AAA TAT TCA GAG GAA  
G G G A  
1559

Ser Lys Leu Asn Arg Glu Lys Ile Asp Gly Val Lys Leu Glu Ser Met Gly Val Tyr Gln  
TCA AAG TTA AAC AGG GAA AAA ATT GAT GGA GTG AAA TTG GAA TCA ATG GGA GTC TAT CAG  
C G A G A  
1619

Ile Leu Ala Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Val Leu Leu Val Ser Leu Gly Ala  
ATT CTG GCG ATC TAC TCA ACT GTC GCC AGT TCA CTG CTC CTT TTG GTC TCC CTG GGG GCA  
1679

Ile Ser Phe Trp Met Cys\* Ser Asn Gly Ser Leu Gln Cys\* Arg Ile Cys\* Ile  
ATC AGC TTC TGG ATG TGT TCT AAT GGG TCT TTG CAG TGC AGA ATA TGC ATC TGA GAC CAG  
T T T  
1739

AAT TTC AGA AAT ATA AGA AAA AAA CAC CCT TGT TTC TAC T  
G G

Рис. 2. Нуклеотидная последовательность гена гемагглютиниона вируса гриппа А/Хабаровск/7/77 (первичная структура цепи, комплементарной вирионной РНК, и аминокислотная последовательность гемагглютиниона этого штамма). Под нуклеотидной структурой приведены нуклеотиды, по которым секвенированный нами ген отличается от соответствующего гена штамма А/PR/8/34, над аминокислотной последовательностью – соответствующие аминокислотные различия между этими двумя штаммами. Звездочками помечены цистеины, потенциально участвующие в образовании дисульфидных связей

Нуклеотидные изменения в отдельных участках кДНК гена гемагглютинина вируса гриппа А двух штаммов

| Характеристика участка                | Нетранслируемая область | Сигнальный пептид | HA <sub>1</sub> | HA <sub>2</sub> | HA   |
|---------------------------------------|-------------------------|-------------------|-----------------|-----------------|------|
| Длина (число нуклеотидов) для штаммов |                         |                   |                 |                 |      |
| А/Хабаровск/7/77                      | 81                      | 51                | 981             | 666             | 1779 |
| А/PR/8/34                             | 80                      | 51                | 981             | 666             | 1778 |
| Число различий                        | 5                       | 4                 | 98              | 31              | 138  |
| Степень гомологии, %                  | 93,8                    | 92,2              | 90              | 95,3            | 92,2 |

Таблица 2

Аминокислотные изменения в отдельных участках гемагглютининов вируса гриппа А двух штаммов

| Характеристика участка                            | Сигнальный пептид | HA <sub>1</sub> | HA <sub>2</sub> | HA   |
|---|-------------------|-----------------|-----------------|------|
| Длина (число аминокислотных остатков) для штаммов |                   |                 |                 |      |
| А/Хабаровск/7/77                                  | 17                | 327             | 222             | 566  |
| А/PR/8/34   | 17                | 327             | 222             | 566  |
| Число различий                                    | 3                 | 42              | 7               | 52   |
| Степень гомологии, %                              | 82,4              | 87,2            | 96,8            | 90,8 |

производства ВНИИ прикладной энзимологии (Вильнюс). Рестриктазы *EcoRI* и *PstI* были любезно предоставлены С. А. Грачевым, рестриктаза-изоизомер *AvaII* — С. Х. Дегтяревым.

Вирус гриппа X/Ленинград/54/1 нарабатывали в хориоаллантоисной полости 9-дневных куриных эмбрионов по методу [4]. Аллантоисную вируссодержащую жидкость осветляли центрифугированием на центрифуге J-2-21 (Beckman, США) с использованием ротора JA-10 при 5000 об./мин в течение 20–30 мин. Затем из осветленного раствора вирус осаждали центрифугированием при 20 000 об./мин в течение 60 мин (ротор JA-20). Осадок вируса (из 10 л аллантоисной жидкости) суспендировали в 18 мл буфера STE\* и насливали по 3 мл на 6×30 мл градиента сахарозы (20–60%), приготовленной на STE-буфере. Центрифугировали 6 ч (ротор SW-28 центрифуги L-5-75 фирмы Beckman (США)) при 26 000 об./мин и 4° С. Зону, содержащую вирус (визуально примерно в середине пробирки), собирали с помощью шприца с длинной иглой (игла для пункций), далее вирус разбавляли STE-буфером в 4 раза и осаждали центрифугированием (ротор JA-20) при 20 000 об./мин в течение 1,5 ч. Затем осадок вируса суспендировали в 5 мл STE-буфера и сразу же использовали для выделения РНК. Все операции по очистке и центрифугированию вируса проводили при 4° С.

Выделение РНК из вируса гриппа проводили по методу [5], усовершенствованному нами. 5 мг протеиназы К инкубировали 30 мин при 37° С в 1 мл STE-буфера, содержащего 0,5% додецилсульфат натрия. Затем этот раствор добавляли к 5 мл суспензии вируса, инкубировали 10–15 мин при ~20° С, добавляли 10% раствор додецилсульфата натрия до конечной концентрации 1%. Инкубировали при ~20° С еще 10–15 мин, затем добавляли 6 мл фенола, насыщенного 0,01 М EDTA в 0,1 М трис-НСl, рН 8,0. После пятиминутного встряхивания смесь центрифугировали 10–15 мин при 15° С в центрифуге ОШн-3 (СССР) при 3000 об./мин (2000g). Водную фазу отбирали и еще 3–4 раза экстрагировали таким же объемом

\* Буфер STE: 0,1 М NaCl, 1 мМ EDTA, 0,01 М трис-НСl (рН 7,5).

фенола до исчезновения белого слоя в интерфазе. Затем водную фазу экстрагировали еще 3—4 раза фенолом, насыщенным 0,3 М ацетатом натрия\* (рН 5,5), до исчезновения белого слоя в интерфазе. После этого водную фазу собирали, добавляли 3 М ацетат натрия с рН 5,5 до конечной концентрации 0,3 М и 2,5 объема перегнанного этанола. После перемешивания пробирку выдерживали 20 мин при  $-70^{\circ}\text{C}$ , центрифугировали так же, как и в случае фенольной экстракции, осадок РНК переосаждали из воды с помощью ацетата натрия и этанола еще 3 раза. РНК хранили в виде осадка под спиртом при  $-70^{\circ}\text{C}$ . Количество РНК измеряли по поглощению ее разбавленного раствора при 260 нм, принимая, что 25  $\text{OE}_{260}$  РНК соответствуют 1 мг. Выход РНК составлял обычно 1% по весу от исходного количества вируса, очищенного в сахарозном градиенте.

*Синтез первой цепи кДНК на геномной РНК вируса гриппа* проводили в реакционной смеси, содержащей 0,05 М трис- $\text{HCl}$  (рН 8,3), 0,15 М  $\text{KCl}$ , 0,005 М  $\text{MgCl}_2$ , 0,01 М меркаптоэтанол, 0,5—1,0 мМ каждый из четырех dNTP, 50—100 мкг/мл вирусной РНК, 10—25 мкг/мл специфического олигонуклеотида-затравки — d(A-G-C-A-A-A-A-G-C-A-G-G), синтезированного по методу [8], и 60—100 ед. акт./мл обратной транскриптазы. Реакцию проводили при  $42^{\circ}\text{C}$  в течение 2 ч и останавливали добавлением раствора 0,5 М EDTA до концентрации 0,02 М. К реакционной смеси добавляли равный объем фенола, насыщенного 0,01 М EDTA в 0,1 М трис- $\text{HCl}$  (рН 8,3), встряхивали 5 мин и центрифугировали 5 мин при 5000g. Водную фазу собирали, добавляли к ней 3 М ацетат натрия (рН 5,5) до конечной концентрации 0,3 М и два объема этанола. Смесь выдерживали 2 ч при  $-20^{\circ}\text{C}$ , центрифугировали 5 мин при 5000g и  $4^{\circ}\text{C}$ . Осадок растворяли в свежеприготовленном растворе 0,2 М  $\text{NaOH}$  (объем этого раствора должен быть равен  $\frac{1}{3}$  исходного объема реакционной смеси), инкубировали 16 ч при  $37^{\circ}\text{C}$  до полного гидролиза РНК, после чего рН этой смеси доводили до 7,0—7,5 путем добавления 3 М ацетата натрия (рН 5,5). Далее кДНК пропускали через колонку (2 мл) с сефадексом G-75 (элюция буфером, содержащим 0,02 М трис- $\text{HCl}$  (рН 8,3) и 0,15 М  $\text{NaCl}$ ). Поглощение в УФ-свете элюата с колонки регистрировали с помощью микроспектрофотометра «Милихром» (СССР). Фракции, содержащие кДНК, объединяли, смешивали с двумя объемами этанола, выдерживали 2—3 ч при  $-20^{\circ}\text{C}$ , центрифугировали 15 мин при 5000g и  $4^{\circ}\text{C}$ . Осадок кДНК переосаждали из  $\text{H}_2\text{O}$  с помощью ацетата натрия и этанола, промывали этанолом и сушили. Высушенный осадок растворяли в  $\text{H}_2\text{O}$  и использовали в реакции синтеза второй цепи кДНК. Выход кДНК составлял 10—15% по отношению к исходному количеству вирусной РНК (определено по оптическому поглощению при 260 нм).

*Синтез второй цепи ДНК на матрице одноцепочечной кДНК.* На первом этапе синтез вели с помощью обратной транскриптазы, на втором — с помощью фрагмента Клепова ДНК-полимеразы I из *E. coli*. Условия реакции на первом этапе аналогичны описанным для первой цепи, за исключением того, что концентрацию ревертазы увеличивали до 200—300 ед. акт./мл, а в качестве специфического олигонуклеотида-затравки использовали d(A-G-T-A-G-A-A-A-C-A-A-G-G). Реакцию вели при  $42^{\circ}\text{C}$  в течение 2 ч в присутствии 0,5 мМ [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]dTTP и останавливали добавлением EDTA до концентрации 20 мМ и равного объема фенола, насыщенного 0,1 М трис- $\text{HCl}$ , рН 8,3. Смесь встряхивали 5 мин, центрифугировали 10 мин при 5000g, водную фазу отбирали. Из водной фазы двухцепочечную кДНК осаждали и переосаждали этанолом в присутствии 2 М ацетата аммония. Осадок кДНК промывали этанолом, сушили в вакууме и после растворения в  $\text{H}_2\text{O}$  использовали на втором этапе синтеза кДНК.

Достройку второй цепи кДНК (второй этап) проводили в реакционной смеси, содержащей 0,02 М трис- $\text{HCl}$  (рН 7,6), 0,01 М  $\text{MgCl}_2$ , 0,01 М меркаптоэтанол, 50 мкг/мл бычьего сывороточного альбумина, 0,2 мМ каж-

\* В методиках, приведенных в «Экспериментальной части», использовали раствор ацетата натрия, рН которого был доведен уксусной кислотой до 5,5.

дый из четырех dNTP, 20 мкг/мл кДНК, 20 ед. акт./мл фрагмента Кле-нова ДНК-полимеразы I. Реакцию вели 90 мин при 37° С, останавливали добавлением EDTA до концентрации 20 мМ и равного объема фенола, насыщенного 0,1 М трис-НСl, рН 8,3. Смесь встряхивали 5 мин и центрифугировали 10 мин при 5000 g и 16° С. Водную фазу отбирали и кДНК осаждали с помощью ацетата натрия и этанола.

Использованный нами двухстадийный метод достройки второй цепи кДНК не является общепринятым, но, по нашим наблюдениям, эта процедура весьма существенно увеличивала выход второй цепи кДНК (на ~30%).

*Синтез oligo(dC)-тракта на 3'-концах двухцепочечной кДНК.* После осаждения этанолом двухцепочечную кДНК обессоливали на колонке с сефадексом G-75 в 0,02 М какодилатном буфере, рН 7,0. Поскольку препарат кДНК представляет собой гетерогенную по молекулярным массам смесь, синтез oligo(dC)-тракта проводили в нескольких вариантах, которые различались временем инкубации с ферментом. Мы исходили из того, что хотя бы в одном из вариантов будет достигнут оптимальный размер коннекторов, равный 10—15 нуклеотидным остаткам. oligo(dC)-Тракт синтезировали в основном согласно методике [15] в реакционной смеси, содержащей 0,14 М трис-какодилат (рН 7,0), 0,1 мМ дитиотреит, 1 мМ CoCl<sub>2</sub>, 50 пмоль/мл «концов» двухцепочечной кДНК, 10 мкМ dCTP и 20 ед. акт./мл концевой дезоксинуклеотидилтрансферазы. Время инкубации при 37° С в разных вариантах изменяли от 5 до 20 мин. Реакцию останавливали добавлением EDTA до 0,02 М, реакционные смеси всех вариантов объединяли, депротеинизировали фенольной экстракцией (фенол насыщали буфером 0,1 М трис-НСl, рН 8,3) и осаждали этанолом в присутствии 0,3 М ацетата натрия, рН 5,5.

Для выделения полноразмерных двухцепочечных кДНК гена гемоглобина проводили электрофорез двухцепочечной кДНК с достроенными oligo(dC)-коннекторами в 3% полиакриламидном геле по [16] (с. 178) параллельно с маркерами молекулярной массы *bspI*-гидролизатом ДНК фага T7 [9]. Гель после электрофореза экспонировали с рентгеновской пленкой РМ-1 в течение 1 сут. Область геля, содержащую радиоактивную двухцепочечную кДНК размерами от 1400 до 2000 нуклеотидных пар, вырезали, затем извлекали ДНК из геля путем электрооэлюции на DEAE-бумагу DE-81 (Whatman, Англия). Электрооэлюцию осуществляли в течение 2 ч в аппарате фирмы ISCO (США) при 300 В. ДНК с бумаги элюировали 1,5 М NaCl в гидрофобизованную пробирку. Выделенную ДНК осаждали и двукратно пересаждали этанолом в присутствии 5 мкг бычьего сывороточного альбумина. Выход ДНК после электрооэлюции составлял 30% от исходно имевшейся ДНК в геле (определено по радиоактивности).

*Подготовка вектора.* ДНК плазмиды pBR327 [10] гидролизали рестриктазой *Pst*I. Реакцию останавливали добавлением EDTA до концентрации 0,01 М, смесь депротеинизировали фенольной экстракцией, осаждали этанолом с 0,3 М ацетатом натрия, рН 5,5. После трех пересаждений ДНК растворяли и с помощью концевой дезоксинуклеотидилтрансферазы на ее 3'-концах синтезировали oligo(dC)-коннекторы длиной 10—15 нуклеотидов. Их размер определяли по включению [<sup>3</sup>H]dGTP. Условия синтеза аналогичны описанным выше для случая двухцепочечной кДНК. Реакцию останавливали добавлением EDTA до 0,01 М, ДНК осаждали этанолом из 0,3 М ацетата натрия, рН 5,5. После осаждения осадок ДНК растворяли и подвергали электрофорезу в 1% агарозе в буфере, рН 8,1 (0,02 М ацетат натрия, 0,001 М EDTA, 0,04 М трис-ацетат). Область геля, содержащую линейную форму плазмидной ДНК, вырезали, ДНК выделяли электрооэлюцией, как описано выше. Выделенный вектор хранили в буфере 0,01 М трис-НСl (рН 7,5) с 1 мМ EDTA при -20° С.

*Отжиг кДНК с вектором.* Эквимольные количества вектора и двухцепочечной кДНК инкубировали 15 мин в смеси 0,02 М трис-НСl (рН 7,6), 0,1 М NaCl и 1 мМ EDTA при 65° С. Затем смесь медленно (в термоста-



те) охлаждали до 56° С и инкубировали при этой температуре еще 3 ч, после чего охлаждали в течение ночи до ~20° С.

Клетки JC5183 трансформировали гибридными плазидами по ([16], с. 252). Колонии с фенотипом  $Ar^rTc^r$  анализировали ([16], с. 315) путем гибридизации *in situ* с  $^{32}P$ -мечеными фрагментами РНК гена гемагглютинина, выделенной путем электрофореза суммарной РНК вируса гриппа в 3% полиакриламидном геле с 7 М мочевиной и последующей электроэлюции.

ДНК из рекомбинантных плазмид для первичного анализа рестрикцией *Pst*I выделяли методом кипячения ([16], с. 366), препаративную наработку проводили по методу [16] (с. 90). Рестрикции плазмид осуществляли в буфере, содержащем 0,01 М  $MgCl_2$ , 0,05 М NaCl, 0,01 М меркаптоэтанол и 0,05 М трис-HCl (рН 8,2). Первичную структуру определяли модифицированным методом Максама — Гилберта [11, 12].

Авторы выражают признательность С. А. Грачеву и С. Х. Дегтяреву за предоставление высокоочищенных препаратов рестриктаз, В. В. Старикову и Б. Г. Гриненкову за содействие в обеспечении вирусным материалом, Ю. С. Скоблову за синтез радиоактивных дезоксирибонуклеозид-5'-[ $\alpha$ - $^{32}P$ ]трифосфатов высокой удельной активности и чистоты.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. McCauley J. W., Mahy B. W. J. *Biochem. J.*, 1983, v. 211, № 2, p. 281–294.
2. Webster R. G., Laver W. G., Air G. M., Schield G. C. *Nature*, 1982, v. 296, № 5853, p. 115–121.
3. Caton A. J., Brownlee G. G., Yewdell J. W., Gerhard W. *Cell*, 1982, v. 31, № 2, p. 417–427.
4. Шолов А. А., Козлов Ю. В., Курманова А. Г., Горбулев В. Г., Селиванов Я. М., Жданов В. М., Баев А. А. *Молекулярн. биология*, 1981, т. 15, № 6, с. 1371–1384.
5. Palese P., Schulman J. L. *Virology*, 1976, v. 47, p. 876–884.
6. Robertson J. S. *Nucl. Acids Res.*, 1979, v. 6, № 12, p. 374–385.
7. Sleight M. I., Both G. W., Brownlee G. G. *Nucl. Acids Res.*, 1979, v. 7, № 4, p. 879–894.
8. Narang S. H., Brousseau R., Hsiung H. M., Michniewicz J. J. *Meth. Enzymol.*, 1980, v. 65, p. 610–620.
9. Dunn J. J., Studier F. W. *J. Mol. Biol.*, 1983, v. 166, № 4, p. 477–535.
10. Soberon X., Covarrubias L., Bolivar F. *Gene*, 1980, v. 9, № 3–4, p. 287–305.
11. Maxam A. M., Gilbert W. G. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1977, v. 74, № 2, p. 560–564.
12. Коробко В. Г., Грачев С. А., Колосов М. Н. *Биоорганич. химия*, 1977, т. 4, № 9, с. 1281–1283.
13. Winter G., Fields S., Brownlee G. G. *Nature*, 1981, v. 292, № 5818, p. 72–75.
14. Raymond F. L., Caton A. J., Cox N. J., Kendall A. P., Brownlee G. G. *Nucl. Acids Res.*, 1983, v. 11, № 20, p. 7191–7203.
15. Raychoudhury R. *J. Biol. Chem.*, 1972, v. 247, № 22, p. 3910–3927.
16. Maniatis T., Fritsch F. F., Sambrook J. *Molecular Cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratories, USA, 1982.

Поступила в редакцию  
2.IV.1984

#### SYNTHESIS OF THE FULL-LENGTH DNA-COPY OF THE HEMAGGLUTININ RNA OF THE INFLUENZA A VIRUS H1N1-SUBTYPE, ITS CLONING AND SEQUENCING

BEKLEMISHEV A. B., BLINOV V. M., VASSILENKO S. K., GOLOVIN S. Ya.,  
GUTOROV V. V., KARGINOV V. A., MAMAEV L. V., MIKRYUKOV N. N.,  
NETESOV S. V., PETRENKO V. A., PETROV N. A., SANDAKHCHIEV L. S.

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

Full-length DNA-copy of hemagglutinin gene RNA of influenza A virus strain A/Leningrad/54/1 was synthesized and cloned in *E. coli* plasmid pBR 327. Its primary structure was determined by a modified Maxam — Gilbert procedure. The nucleotide sequence of this gene was compared with sequences of analogous genes of influenza strains A/USSR/90/77 and A/PR/8/34. An addition of one nucleotide in non-translated region was found in the former.