



УДК 578.832.1А:578.224'242.4:577.215

СИНТЕЗ, КЛОНИРОВАНИЕ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПЕРВИЧНОЙ СТРУКТУРЫ ПОЛНОРАЗМЕРНОЙ ДНК-КОПИИ ГЕНА НЕЙРАМИНИДАЗЫ ВИРУСА ГРИППА А ПОДТИПА Н1N1

*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 П. В.*

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

Проведены синтез, клонирование и определение первичной структуры полноразмерной ДНК-копии гена нейраминидазы вируса гриппа А/Хабаровск/34457/77. Первичная структура гена сравнена со структурами аналогичных генов других штаммов вируса гриппа, а также со структурой мизоцима из цыпленка.

Один из самых результативных подходов, позволяющих выяснить пути эволюции вируса гриппа, основан на сравнении первичных структур генов, кодирующих гемагглютинин и нейраминидазу, из филогенетически различных вариантов вируса. Возможно, таким образом удастся прогнозировать главные антигенные изменения гемагглютинина и нейраминидазы, а также получить универсальную синтетическую противогриппозную вакцину на основе химически синтезированных антигенных детерминант поверхностных белков различных серотипов вируса гриппа.

Исходя из вышесказанного, мы исследовали строение поверхностных белков вируса гриппа вакцинного штамма Х/Ленинград/54/1 Н1N1-подтипа, который является рекомбинантом штаммов А/PR/8/34 и А/Хабаровск/34457/77, отобранным по антигенным свойствам штамма А/Хабаровск/34457/77. Первичная структура гена гемагглютинина этого штамма была опубликована нами ранее [1]. В настоящей работе определена полная первичная структура гена нейраминидазы штамма Х/Ленинград/54/1 Н1N1-подтипа.

Подробные методики получения клонов приведены в работе [1]. Методом гибридизации *in situ* были отобраны клоны, несущие ДНК-копию гена нейраминидазы.

По результатам гидролиза рестриктазой *Pst*I были отобраны три клона, несущие наиболее протяженные вставки: 64-02, 63-15, 63-06. После установления подробной рестриктной карты была выработана стратегия секвенирования (рис. 1). Рекомбинантная ДНК из клона 64-02 содержала полную копию гена нейраминидазы. Более 90% его первичной структуры было установлено по двум комплементарным цепям. Чтобы исключить

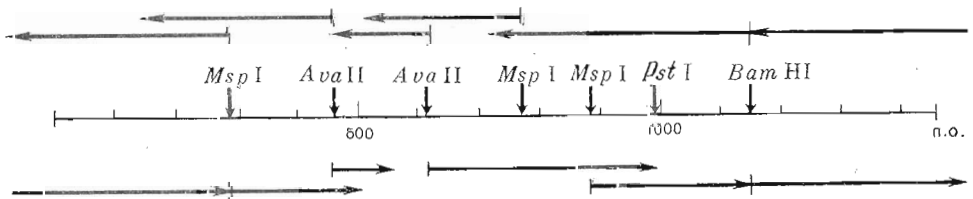


Рис. 1. Схема стратегии секвенирования. Отмечены только сайты узнавания рестриктаз, использованных при определении первичной структуры. Стрелки показывают направление секвенирования и точки начала и конца секвенированных областей меченых по 3'-концам рестрикционных фрагментов. Выход стрелок за пределы гена означает, что для секвенирования использовались фрагменты плазмиды, содержащие кроме части клонированного гена также часть плазмидной ДНК, т. е. участки стыка плазмиды и кДНК прочитывались насквозь

возможность случайного отбора для секвенирования минорного варианта гена, ~40% последовательности было определено также для ДНК клона 63-06 и более 50% — для клона 63-15, в сумме же более 80% последовательности ДНК клона 64-02 было сопоставлено с соответствующими последовательностями ДНК из двух других клонов. Ни в одном случае не было обнаружено различий в структуре.

Таким образом, нами установлена полная нуклеотидная последовательность гена, кодирующего нейраминидазу вируса гриппа штамма Х/Ленинград/54/1, длиной 1462 нуклеотида (рис. 2).

В этой последовательности имеется единственная протяженная рамка считывания (нуклеотиды с 20-го по 1430-й), в пределах которой возможно кодирование белка, состоящего из 470 аминокислотных остатков. По размеру он ближе к нейраминидазе подтипа N2 (469 аминокислот) [2], чем к более ранним изолятам подтипа N1 (454 аминокислоты у А/PR/8/34 [3] и 453 аминокислоты у А/WSN/33 [4]), и, следовательно, является нейраминидазой штамма А/Хабаровск/34457/77.

Как и у гена гемагглютинаина штамма А/Хабаровск/34457/77 [1], в 3'-концевой нетранслируемой области гена нейраминидазы этого штамма в районе присоединения poly(A) к мРНК имеется дополнительный нуклеотидный остаток А (на рис. 2 подчеркнут). Подобное изменение длины нетранслируемой области генов нейраминидазы наблюдается у некоторых штаммов подтипа N2 [5].

В N-концевой части белка отсутствуют делеции больших участков аминокислотной последовательности, характерные для нейраминидаз ранних (до 1935 г.) изолятов вируса гриппа [6]. В трехмерной структуре нейраминидазы подтипа N2 [7] эти делеции локализованы в районе длинной и тонкой «ножки», соединяющей глобулярную часть молекулы с мембраной, и, вероятно, не оказывают заметного влияния на функциональные свойства белка. Возможный механизм возникновения таких делеций, аналогичный механизму образования субгеномных РНК вследствие «перескока» полимеразного комплекса через виток рибонуклеопротеида, изложен в работе [8]. Анализ делетированных участков (рис. 3) свидетельствует о существовании общего вирусного предшественника, который ближе по первичной структуре к более поздним изолятам (после 1942 г.). Вероятно, эти делеции произошли уже после выделения штаммов в ходе многочисленных лабораторных пассажей.

По сравнению с нейраминидазой штамма А/PR/8/34 возник дополнительный остаток Thr в положении 436, где соответствующая последовательность нуклеотидов в мРНК из ААААААСАА превратилась в ААААААСААСАА. Аналогичное явление дупликации триплета отмечено в структуре гемагглютинаина штамма А/Victoria/3/75 [9], где последовательность АСААСА превратилась в АСААСААСА.

Для генов нейраминидаз современного подтипа N1 опубликованы только частичные последовательности нескольких сотен нуклеотидов с 3'-конца РНК. В 203 нуклеотидах штамма А/Memphis/10/78 нет отличий от штамма А/Хабаровск/34457/77 [10]. Сравнение с 278 нуклеотидами штамма А/USSR/90/77 выявляет семь различий, два из которых приводят к консервативным заменам аминокислот, расположенных в пространственной структуре белка в районе «ножки» [6, 11]. На 194 нуклеотида А/FW/1/50 приходится только два различия, в то время как для более раннего изолята А/Bellamy/42 их 12 на 240 (6 аминокислотных), а для более позднего А/Loyang/4/57—9 на 189 (3 аминокислотных) [10]. Это еще раз подтверждает близость современных изолятов подтипа N1N1 именно к штаммам 1950—1951 гг.

Сравнение аминокислотной последовательности нейраминидазы штамма А/Хабаровск/34457/77 и некоторых других нейраминидаз приведено на рис. 3 и 4*. Имеется выраженная гомология двух подтипов нейрами-

* Последовательность аминокислот на рис. 3 и 4 приводится в однобуквенном коде в соответствии с рекомендацией IUPAC — IUB: А — Ala, С — Cys, D — Asp, E — Glu, F — Phe, G — Gly, H — His, I — Ile, K — Lys, L — Leu, M — Met, N — Asn, P — Pro, Q — Gln, R — Arg, S — Ser, T — Thr, V — Val, W — Trp, Y — Tyr.

Met Asn Pro Asn Gln Lys Ile Ile Thr Ile Gly Ser Ile 13:
AG CAA AAG CAG GAG TTT AAA ATG AAT CCA AAT CAG AAA ATA ATA ACC ATT GGA TCA ATC
G G 59

Leu Val Val Leu
* Cys Met Ala Ile Gly Ile Ile Ser Leu Ile Leu Gln Ile Gly Asn Ile Ile Ser Ile Trp 33:
TGT ATG GCA ATC GGA ATA ATT AGT CTA ATA TTG CAA ATA GGG AAT ATT ATC TCA ATA TGG
C T G C C A 119

Ile
Val Ser His Ser Ile Gln Thr Gly Ser Gln Asn His Thr Gly Ile Cys* Asn Gln Arg Ile 53:
GTT AGC CAC TCA ATT CAA ACT GGA AGT CAA AAC CAT ACA GGA ATA TGC AAC CAA AGA ATC
A T AC 179

Lys
Ile Thr Tyr Glu Asn Ser Thr Trp Val Asn Gln Thr Tyr Val Asn Ile Ser Asn Thr Asn 73:
ATT ACC TAT GAA AAT AGC ACC TGG GTA AAT CAA ACA TAT GTT AAT ATT AGC AAC ACT AAC
A 239

Val Val Ala Gly Lys Asp Thr Thr Ser Val Ile Thr
GTT GTT GCT GGA AAG GAC ACA ACT TCA ATG ACA TTA GCC GGC AAT TCA TCT CTT TGT CCT 93:
G T A C 299

Ile Arg Gly Trp Ala Ile Tyr Ser Lys Asp Asn Ser Ile Arg Ile Gly Ser Lys Gly Asp 113:
ATC CGT GGG TGG GCT ATA TAC AGC AAA GAC AAC AGC ATA AGA ATT GGT TCC AAA GGA GAT
T C 359

Val Phe Val Ile Arg Glu Pro Phe Ile Ser Cys* Ser His Leu Glu Cys* Arg Thr Phe Phe 133:
GTT TTT GTC ATA AGA GAA CCT TTT ATA TCA TGT TCT CAC TTG GAA TGC AGA ACC TTT TTT
G C T 419

Arg
Leu Thr Gln Gly Ala Leu Leu Asn Asp Lys His Ser Asn Gly Thr Val Lys Asp Arg Ser 153:
CTG ACC CAA GGC GCT CTA TTA AAT GAC AAG CAT TCA AAT GGG ACC GTT AAG GAC AGA AGC
T C T C G G T 479

Val
Pro Tyr Arg Ala Leu Met Ser Cys* Pro Ile Gly Glu Ala Pro Cys* Tyr Asn Ser Arg 173:
CCT TAT AGG GCC TTA ATG AGC TGT CCT ATA GGT GAA GCT CCG TGT CCA TAC AAT TCA AGG
C G C CC G A 539

His
Phe Glu Ser Val Ala Trp Ser Ala Ser Ala Cys* His Asp Gly Met Gly Trp Leu Thr Ile 193:
TTT GAA TCG GTT GCT TGG TCA GCA AGT GCA TGT CAC GAT GGC ATG GGC TGG TGG CTA ACA ATC
T 599

Asn
Gly Ile Ser Gly Pro Asp Asp Gly Ala Val Ala Val Leu Lys Tyr Asn Gly Ile Ile Thr 213:
GGA ATT TCT GGT CCA GAT GAT GGA GCA GTG GCT GTA CTA AAA TAC AAC GGC ATA ATA ACT
A A 659

Lys
Glu Thr Ile Lys Ser Trp Arg Lys Gln Ile Leu Arg Thr Gln Glu Ser Glu Cys* Val Cys* 233:
GAA ACC ATA AAA AGT TGG AGG AAG CAA ATA TTA AGA ACA CAA GAG TCT GAA TGT GTC TGT
A G G C 719

Leu
Val Asn Gly Ser Cys* Phe Thr Ile Met Thr Asp Gly Pro Ser Asp Gly Pro Ala Ser Tyr 253:
GTA AAC GGT TCA TGT TTT ACC ATA ATG ACC GAT GGC CCG AGT GAT GGG CCG GCC TCG TAC
T T 779

Asn
Lys
Arg Ile Phe Lys Ile Glu Lys Gly Lys Val Ile Thr Lys Ser Ile Glu Leu Asp Ala Pro Asn 273:
AGA ATC TTC AAA ATC GAG AAG GGG AAG ATT ACT AAA TCA ATA GAG TTG GAT GCA CCC AAT
A T G A G 839

Lys
Ser His Tyr Glu Glu Cys* Ser Cys* Tyr Pro Asp Thr Gly Thr Val Met Cys* Val Cys* Arg 293:
TCT CAT TAC GAG GAA TGT TCC TGT TAC CCA GAC ACC GGC ACA GTG ATG TGT GTG TGC AGA
C T A 899

Asp	Asn	Trp	His	Gly	Ser	Asn	Arg	Pro	Trp	Val	Ser	Phe	Asn	Gln	Asn	Leu	Asp	Tyr	Gln	313	
GAC	AAT	TGG	CAT	GGT	TCG	AAT	CGA	CCT	TGG	GTG	TCT	TTT	AAT	CAA	AAC	CTG	GAT	TAT	CAA		
						C	G	A				C	G							959	
Ile	Gly	Tyr	Ile	Cys*	Ser	Gly	Val	Phe	Gly	Asp	Asn	Pro	Arg	Pro	Lys	Asp	Gly	Lys	Gly	333	
ATA	GGA	TAC	ATC	TGC	ACT	GGG	GTT	TTC	GCT	GAC	AAT	CCG	CGT	CCC	AAA	GAT	GGA	AAA	GGC		
											C							C		1019	
Ser	Cys*	Gly	Pro	Val	Tyr	Asn	Val	Asp	Gly	Ala	Asn	Val	Lys	Gly	Phe	Ser	Tyr	Arg	Tyr	353	
AGC	TGT	GAT	CCA	GTA	AAT	GTT	GAT	GGA	GCA	GAC	GGA	ATA	AAG	GGG	TTT	TCA	TAC	AGG	TAT		
	G			G	T				A		G		A			T				1079	
Gly	Asn	Gly	Val	Trp	Ile	Gly	Arg	Thr	Lys	Ser	Asn	Ser	Ser	Arg	Lys	Gly	Phe	Glu	Met	373	
GGT	AAT	GGT	GTT	TGG	ATA	GGA	AGG	ACT	AAA	AGT	AAC	AGC	TCC	AGA	AAA	GGA	TTT	GAG	ATG		
								C			C	T			C	T	G			1139	
Ile	Trp	Asp	Pro	Asn	Gly	Trp	Thr	Asp	Thr	Asp	Ser	Asn	Phe	Leu	Val	Lys	Gln	Asp	Val	393	
ATT	TGG	GAT	CCT	AAT	GGA	TGG	ACA	CAT	ACC	GAT	AGT	AAT	TTC	TTA	GTG	AAA	CAG	GAT	GTA		
								G	T			G		CT		GG	A		T	1199	
Val	Ala	Met	Thr	Asp	Trp	Ser	Gly	Tyr	Ser	Gly	Ser	Phe	Val	Gln	His	Pro	Glu	Leu	Thr	413	
GTG	GCA	ATG	ACT	GAT	TGG	TCA	GGG	TAC	AGC	GGA	ACT	TTC	GTT	CAA	CAT	CCT	GAG	CTA	ACA		
								T		G										1259	
Gly	Leu	Asp	Cys*	Met	Arg	Pro	Cys*	Phe	Trp	Val	Glu	Leu	Ile	Arg	Gly	Arg	Pro	Arg	Glu	433	
GGA	TTG	GAC	TGT	ATG	AGG	CCT	TGC	TTC	TGG	GTT	GAA	TTA	ATC	AGA	GGA	CGA	CCC	AGA	GAA		
	G	C	A		A	G								G			T	A		1319	
Lys	Thr	Thr	Ile	Trp	Thr	Ser	Ala	Gly	Ser	Ser	Ile	Ser	Phe	Cys*	Gly	Val	Asn	Ser	Asp	Thr	453
AAA	ACA	ACA	ATC	TGG	ACT	AGT	GCG	AGC	AGC	AGC	ATT	TCT	TTT	TGT	GGC	GTC	AAT	AGT	GAT	ACT	
							C														1379
Val	Asn	Trp	Ser	Trp	Pro	Asp	Gly	Ala	Glu	Leu	Pro	Phe	Thr	Ile	Asp	Lys					
CTA	AAT	TGG	TCT	TGG	CCA	GAC	GGT	GCC	GAG	TTG	CCA	TTC	ACC	ATT	GAC	AAG	TAG	TCC	GTT		
	G							T										T			1439
AAA	AAA	AAC	TCC	TTG	TTT	CTA	CT														
C																					

Рис. 2. Первичная структура гена нейраминидазы штамма X/Ленинград/54/1 в форме (+)-цепи и выведенная на ее основе аминокислотная последовательность. Внизу приведены нуклеотидные замены, соответствующие гену штамма A/PR/8/34, а сверху — отвечающие им аминокислотные остатки. Отсутствующие у штамма A/PR/8/34 нуклеотидные остатки подчеркнуты

нидаз (рис. 4), что дает возможность пользоваться для обоих белков моделью пространственной структуры, установленной для подтипа N2 [7].

В отличие от нейраминидаз штаммов A/PR/8/34 и A/WSN/33, имеющих соответственно пять и три потенциальных сайта гликозилирования, в нейраминидазе штамма A/Хабаровск/34457/77 имеется девять таких сайтов. Из них два дополнительных приходятся на область вставки 15 аминокислот в N-концевой части молекулы, а появление еще двух объясняется возникновением единичных аминокислотных замен Asp—Asn и His—Asn в положениях 455 и 365 соответственно. Пять из девяти потенциальных сайтов гликозилирования расположены в районе «ножки», и, вероятно, их олигосахаридные цепи участвуют в стабилизации конформации белка [7]. Расположение трех из них топографически соответствует трем потенциальным сайтам гликозилирования в подтипе N2. В области глобулы у подтипов N1 и N2 совпадают два таких сайта в положениях 146 и 235 (234 у N2). У подтипа N1 отсутствует аналог сайта в положении 200 у N2, олигосахаридная цепь которого участвует во взаимодействии с соседней субъединицей, а также негликозилированный у N2 сайт в положении 402. С другой стороны, у подтипа N1 имеется дополнительный потенциальный сайт гликозилирования в положении 455 в поверхностном участке глобулы


```

10      20      30      40      50      60      70      80      90
1  MNPNQKIITIGSICMAIGIISLILQIGNIISIWVSHSIQTGSQNHGTGICNQRIITYENSTWVNGTYVNI SNTNVVAGKDTTSMTLAGNSS L80
1      L V V L          I          N      K      T      ----- VI T      PR8
1      V V          I          GS      K      ----- O S VI T      WSN
1  MNPNQKIITIGSVSLTIATICFLMQIAIQVTTVTLHFQKQYECDSPPANNQVMPCEPIIERNITEIVVLTNWTIEKEICPKLVEYRNWSKP UD

91  LCPIRGWAIYSKONSIRIGSKGVFVIREPFI*SCSHLECR*TFLLTQCALLNDKHSNGTVKDRSPYRALMSPCI*GEAPCFYNSRFESVAWS* L80
76      R          V      S      PR8
75      H      G          I          R      F          V      S      WSN
91  GCKITGFAPFSKDNSIRLSAGGD*IWVTR*EPVSCDPGKCYQFALGQGTTLDNKHSN*OTI*HDRT*PHRTLLMNELGV*PFHLG-TRQVCIGWS UD

181 ASACHDGMGLWTIGISGPD*DDGAVAVLKYNGIITETIKSWRKQIL*LR*TQ*ES*ECV*CN*VG*SC*FTIM*TG*SD*CP*ASY*RFKIEKGIKTKFIELD L80
166      N          L      K      V      N      PR8
165      V          N          N      T          L      K      V      N      WSN
180 SSSCHDCKAWLHVCVTCYDKNATASF*YDGR*LVD*SG*WSON*JL*RT*OE*SE*CV*CI*NC*TCT*VVM*TDC*SAS*GRAD*TKIL*FLIE*E*GKIVH*IS*PLS UD

271 APNSHY*EE*CS*CP*DT*GV*MC*VR*D*N*WH*GS*NR*P*W*FS*FN*DL*YQ*I--GYIC*SG*V*FG*DN*PR*PK*DG*KGS--C-DP*V*ND*GAD*G*IG*FS*Y*R*GN L80
256      K          D      K      --      N      K      T      --      L      Y      N      V      PR8
255      D          D      K      --          T      --      -G      SA      N      V      K      WSN
270 GSAQHVEECS*CP*RY*PG*VR*IC*RD*N*W*KS*NR*PF*V*VD*IN*VK-DYS*ID*SS*Y*V*CS*GL*VG*DR*PN*DR*SS*Y*CR*PN*NE*K*GH*V*K*GW*AF*DG*GN UD

355 CVWIGRTKSN*SR*KGFEM*IWD*PN*GW*TDT*DS*NFLV-KQD*VAM*T*DWS*GY*SG*SV*QHP*ELTGL*DC*MR*CF*W*ELI*RGR*PRE*KT*INT*SG*SSI L80
340      H      H          E      K      S      -R          I          I          L      E      D      -A      A      PR8
339      D      H          E      R      SM-R      I      VR          L      E      D      -A      I      WSN
365 CVW*MGR*T*IS*ED*SR*SG*Y*TF*KV*IG*GW*ST*PN*SK*LQ*IN*RQ*IV*VD*SD*NR*SG*Y*GE*IE----SVEG*K*SC*IN*RC*FY*VELI*RG*RE*Q*TR*VW*TS*NS*IV UD

405 SFCGVNSD*TV*N*WS*W*PD*GAE*LP*FT*IDK
389      D
388      D
411 VFCGTSGY*YGTGS*W*PD*GAD*IN*LMPT

```

Рис. 4. Аминокислотная последовательность нейраминидазы штамма А/Хабаровск/34457/77 (L80) в однобуквенном коде. Ниже приведены аминокислотные замены в последовательности нейраминидаз штаммов А/PR/8/34 (PR8) и А/WSN/33 (WSN), а также последовательности Udogn/72 (UD) – подтипа N2, пунктиром показаны участки делеций. Области гомологии двух подтипов подчеркнуты. Звездочкой отмечены аминокислотные остатки, участвующие в связывании сиаловой кислоты, треугольником – потенциальные сайты гликозилрования

щей дивергенцией [16]. Для лизоцима из куриных эмбрионов известна не только полная аминокислотная последовательность, но и трехмерная структура, а также локализован активный центр и субстратные центры [17]. Поэтому с целью локализации каталитически важных аминокислот в нейраминидазе вируса гриппа штамма А/Хабаровск/34457/77 были сопоставлены область активного центра лизоцима цыпленка (аминокислоты 35–52) [18] и аминокислотная последовательность нейраминидазы вируса гриппа. Наибольшая гомология между каталитическим центром лизоцима и нейраминидазой приходится на районы аминокислот 221–272 и 273–330 в нейраминидазе (рис. 5). При этом в первом домене (221–272) с наибольшей гомологией совпадают обе каталитически активные аминокислоты Glu²²⁸ и Asp²⁴⁴, а для второго домена общим является дипептид Asp³¹¹–Tyr, который наблюдается в активных центрах ряда ферментов этого класса [16] (см. рис. 5). Сходный механизм мультимпликации каталитического центра имеет место в лизоциме видов *Chalaropsis* [19], в котором каталитически активные аминокислоты находятся в первом домене. Представляется вероятным, что за каталитическую активность отвечает именно первый домен нейраминидазы, поскольку только для него имеется гомологичный аналог в нейраминидазе вируса гриппа типа В (на рисунке не показано). Однако необходимы дальнейшие исследования для выяснения локализации каталитического центра нейраминидазы.

Более тщательный анализ аминокислотной последовательности нейраминидазы вируса гриппа позволяет локализовать в общей сложности четыре последовательно расположенных домена, два из которых могут участвовать в связывании с субстратом, а два остальных, вероятно, могут содержать каталитически важные аминокислоты, участвующие непосредственно в гидролизе субстрата. Все локализованные в работе [12] аминокислоты, участвующие в связывании сиаловой кислоты, расположены в пределах этих четырех доменов. Между доменами имеется ограниченная гомология, а также сходная субвторичная структура, поддерживаемая с помощью дисульфидных мостиков [7]. Детальный анализ предполагаемой мультиплетной доменной организации субстратсвязывающих центров

227	Q*ESECVCVNGSCFTIMT*DGPSDGPASYRIFKIEK	260	1
	— — — —		
	†E\$NF---NTQATNRNTD*GSTDYGILQINSRWWC		2
290	CVC*RDNRHNGSNRPWVSFNQNLDYQIGYICSGVFG	323	3
	— — — —		
	†E\$NFNTQATNRNTD*GS---TDYGILQINSRWWC		2

Рис. 5. Сравнение аминокислотных последовательностей каталитического центра лизоцима цыпленка (2) и участков последовательности нейраминидазы штамма А/Хабаровск/34457/77 227—260(1) и 290—323(3). Совпадающие аминокислотные остатки подчеркнуты. Крестиком отмечены каталитически активные аминокислоты лизоцима, звездочкой — аминокислотные остатки нейраминидазы, для которых предполагается участие в связывании сиаловой кислоты

гемагглютинина и нейраминидазы вируса гриппа будет опубликован позднее.

Во время подготовки данной статьи к печати была опубликована первичная структура гена нейраминидазы близкородственного штамма А/USSR/90/77 [20]. Между аминокислотными последовательностями гемагглютининов этих двух штаммов имеется лишь шесть различий. Однако оказалось, что аминокислотные последовательности нейраминидаз у этих двух штаммов различаются по 11 положениям. Поскольку нами в связи с этим были тщательно проверены все участки структуры, по которым имеются различия, и никаких ошибок в наших результатах обнаружено не было, то речь может идти лишь о каком-то аномально высоком уровне мутагенеза в гене нейраминидазы по сравнению с геном гемагглютинина штамма, использованного в работе [20], что представляется маловероятным.

Более подробному обсуждению этого факта будет отведено место в наших будущих сообщениях.

Экспериментальная часть

В работе использовался вирус гриппа типа А Х/Ленинград/54/1 (H1N1), который является рекомбинантом природного штамма А/Хабаровск/34457/77 и высокопродуктивного штамма А/PR/8/34, отобранным по антигенным свойствам штамма А/Хабаровск/34457/77 [21]. Штамм Х/Ленинград/54/1 — отечественного производства.

Подробные методики выделения РНК, синтеза кДНК, клонирования, а также источники всех реактивов и ферментов приведены в нашей предыдущей статье [1]. Секвенирование осуществляли методом Максама — Гилберта [22].

Авторы выражают признательность В. В. Старикову за предоставление препаративных количеств вируса гриппа, Ю. С. Скоблову за синтез дезоксирибонуклеозид-5-[α -³²P]трифосфатов высокой удельной активности, А. П. Донченко за обработку результатов на ЭВМ, С. Х. Дегтяреву за предоставление очищенных рестриктаз.

ЛИТЕРАТУРА

1. Беклемишев А. Б., Блинов В. М., Василенко С. К., Головин С. Я., Гугоров В. В., Каргинов В. А., Мамаев Л. В., Микрюков Н. Н., Негесов С. В., Петренко В. А., Петров Н. А., Сандагчиев Л. С. Биоорганическая химия, 1984, т. 10, № 11, с. 1535—1543.
2. Van Rompu L., Jou W. M., Huylebroeck D., Fiers W. J. Mol. Biol., 1982, v. 161, № 1, p. 1—11.
3. Fields S., Winter G., Brownlee G. G. Nature, 1981, v. 290, № 5812, p. 213—216.
4. Hiti A. L., Nayak D. P. J. Virol., 1982, v. 41, № 2, p. 730—734.
5. Martinez C., del Rio L., Portela A., Domingo E., Ortin J. J. Virol., 1983, v. 130, № 2, p. 539—545.

6. Blok J., Air G. M. *Virology*, 1982, v. 118, № 1, p. 229—234.
7. Varghese J. N., Laver W. G., Colman P. M. *Nature*, 1983, v. 303, № 5912, p. 41—44.
8. Jennings P. A., Finch J. T., Winter G., Robertson J. S. *Cell*, 1983, v. 34, № 2, p. 619—627.
9. Min Jou W., Verhoeven M., Devos R., Saman E., Huylebroeck D., van Rompuy L., Fang R. X., Fiers W. In: Structure and variation in influenza virus/Eds Laver W. G., Air G. M. Elsevier/North Holland, 1980, p. 63—68.
10. 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.
11. Blok J., Air G. M. *Virology*, 1982, v. 121, № 1, p. 221—229.
12. Colman P. M., Varghese J. N., Laver W. G. *Nature*, 1983, v. 303, p. 41—44.
13. Laver W. G., Air G. M., Webster R. G., Markoff L. J. *Virology*, 1982, v. 122, № 2, p. 450—460.
14. Jackson D. C., Webster R. G. *Virology*, 1982, v. 123, № 1, p. 69—77.
15. Webster R. G., Hinshaw V. S., Laver W. G. *Virology*, 1982, v. 117, № 1, p. 93—104.
16. Полевая Л. К. Молекулярн. биология, 1982, т. 16, № 6, с. 1211—1222.
17. Hamauchi K., Hayashi K. In: Molecular basis of enzyme function. Lysozyme. Tokyo: Kodansha Ltd., 1978.
18. Young A., Sippel A. S., Girez M., Schütz G. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1980, v. 77, № 10, p. 5759—5763.
19. Felch J. W., Inagami T., Hash J. H. *J. Biol. Chem.*, 1975, v. 250, № 10, p. 3713—3720.
20. Concannon P., Kwolek C. I., Salser W. A. *J. Virol.*, 1984, v. 50, № 2, p. 654—656.
21. Язю М. А., Исаченко В. А., Молибог Е. В., Ямникова С. С., Воркунова Г. К., Березина О. Н., Иванова В. Т., Клицинова Н. В., Хожлова Г. Г., Антонова И. В., Застельская Л. Я., Жданов В. М. *Вопр. вирусологии*, 1978, № 2, с. 146—151.
22. Maxam A. M., Gilbert W. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1977, v. 74, № 2, p. 560—564.

Поступила в редакцию

31.VII.1984

После доработки

28.XI.1984

SYNTHESIS, CLONING AND SEQUENCING OF A FULL-LENGTH DNA COPY OF THE INFLUENZA VIRUS (H1N1 SUBTYPE) NEURAMINIDASE GENE

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., FROLOV 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) neuraminidase gene has been determined. The predicted amino acid sequence is compared with sequences of neuraminidases from other influenza virus strains. A section of the neuraminidase is found to be homologous to the chicken lysozyme catalytic centre.