



# БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

том 12 \* № 3 \* 1986

## ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 578.113.5 : 578.835

### ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА ДНК-КОПИИ ГЕНА БЕЛКА VP1 ВИРУСА ЯЩУРА A<sub>22</sub>

Онищенко А. М., Петров Н. А., Блинов В. М.,  
Василенко С. К., Сандакчиев Л. С., Бурдов А. Н.\*,  
Иванющенков В. Н.\*<sup>†</sup>, Перевозчикова Н. А.\*

Всесоюзный научно-исследовательский институт молекулярной биологии,  
п. Кольцово Новосибирской обл.;

\*Всесоюзный научно-исследовательский институт ящура МСХ СССР,  
п. Юрьевец Владимирской обл.

Вирус ящура (FMDV), относящийся к семейству пикорнавирусов, вызывает опасное инфекционное заболевание парнокопытных, которое наносит большой экономический ущерб. Профилактика этой болезни считается важнейшей народнохозяйственной проблемой, поскольку эффективных способов лечения не найдено. Как показала мировая практика, иммунизация животных аттенуированными вирусными препаратами или инактивированными противоящурными вакцинами иногда может приводить к появлению ящура вследствие недостаточной инактивации вируса или реверсий к вирулентному фенотипу. Поэтому генно-инженерные варианты получения вакцинальных препаратов путем экспрессии отдельных элементов вирусного генома в клетках некоторых микроорганизмов и химиче-

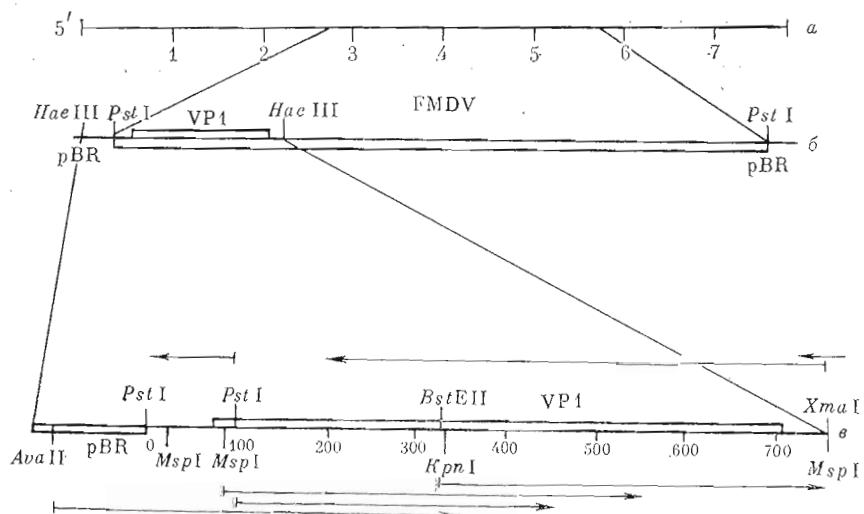


Рис. 1. Выяснение нуклеотидной последовательности кДНК гена белка VP1: а – локализация фрагмента кДНК в геноме вируса ящура (цифры показывают расстояние в тыс. п. о. от 5'-конца генома); в – стратегия секвенирования *Hae*III-фрагмента методом Максама – Гилберта [9]. Стрелки обозначают направление чтения последовательности и размеры расшифрованной области меченные по 3'-концу фрагментов. Цифры показывают расстояние (п.о.) от начала вставки кДНК

D T L V V S V S A G K D F E L R L P I  
 AAGACACTCTGGTGTGCGTTAGCGCCGGCAAGGACTTGAATTGCCCTCCGATTG 60

↓

D P R S Q T T S T G E S A D P V T T T V  
 ACCCCCCGTTCACAAACCACTTCCACCGGGGAGTCTGCAGACCCCTGTCACCACCACCGTTG 120

E N Y G G E T Q V Q R R Q H T D V T F I  
 AAAACTACGGCGGTGAGACACAAGTCCAACGACGTCAACGACGGTACTTCATAA 180

M D R F V K I Q N L N P I H V I D L M Q  
 TGGACAGATTGTAAAGATAACAAAATTGAAACCCCATACTGTCATTGACCTCATGCAAA 240

T H Q H G L V G A L L R A A T Y Y F S D  
 CCCACCAACACGGGTTGGTAGGTGCCCTGTTACGTGCTACGTACTACTCTCTGACC 300

L E I V V R H D G N L T W V P N G A P E  
 TGGAGATTCTGGTACGCCATGACGGTAACCTAACCTGGTACCCATGGAGCACCCGAGG 360

A A L S N M G N P T A Y P K A P F T R L  
 CAGCTCTGTCTAACATGGCAACCCCACCGCTACCCCAAGGCACCATTTACGAGGCTCG 420

A L P Y T A P H R V L A T V Y N G T G K  
 CGCTCCCTACACCGGCCACACCGCGTATTGGCGACAGTGTACAACGGGACGGGCAAGT 480

Y S A G G M G R R R G D L E P L A A R V A  
 ACTCCGCAGGTGGTATGGGCAGACGGGGCAGCTAGAGCCTCTCGCCCCGAGGGTCGGCG 540

A Q L P T S F N F G A I Q A T T I H E L  
 CTCACCTTCCTACTCTTCAACTTGGTGCATTCAAGCCACGACCATCCACGAGCTCC 600

L V R M K R A E L Y C P R P L L A V E V  
 TCGTGCATGAGCGTGGCAACTCTACTGCCAGACCAGTGTGGAGGTGT 660

↓

S S Q D R H K Q K I I A P A K Q L L N F  
 CGTCTCAAGACAGACACAAACAGAAGATCATGACCTGCAAAACAACTTTGAACCTTG 720

D L L K L A G D V E S N P G P  
 ATTTGCTCAAGTGGCAGGAGACGTTGAGTCCAACCCGGGCC 763

Рис. 2. Первичная структура позитивной цепи *HaeIII*-фрагмента кДНК вируса ящура  $A_{22}$  и выведенная из нее аминокислотная последовательность. Стрелками обозначены границы белка VP1

		131	171	43 46
1	NGTGKYSAGGMGRGDLEPLAARVAAQLPTSFNFQAIQATT			QNLQ
2	N S S V FGS P R A Y K E			KS
3	F N N Q - A MGS K A Y K Q			N S
4	N T P - MGS A K A Y R I			NS S
5	D N SDS- S GSI T A X Q A			NS S
6	S AV S MGT VK A Y K DA			S S
7	S TV S MGS K A Y K A			KDVT
8	S TV S MGS K A Y K A			KDVQ
9	S TV S MGS K A Y K A			KDVQ

Рис. 3. Сравнение аминокислотных последовательностей белков VP1 вирусов ящура серотипа А в районе основной антигенней детерминанты: 1 –  $A_{22}$ , 2 –  $A_{12}$  [2], 3 –  $A_{27}$  [5], 4 –  $A_5$  [6], 5 –  $A_{10}$  [3], 6 –  $A_{24}$  [7], 7 –  $A_{Venesuel}$  [5], 8 –  $A/79$  [5], 9 – Аргентина/79 [5]. Для белков 2–9 приведены отличающиеся от структуры 1 аминокислоты; прочерк означает делецию

ский синтез соответствующих пептидов, вероятно, являются основными способами получения безопасных биопрепаратов. Один из важных этапов в создании таких молекулярных вакцин — расшифровка структуры антигенно значимых областей вириона. В настоящей работе нами установлена первичная структура главного антигенного белка капсида (VP1) вируса ящура серотипа A<sub>22</sub> как наиболее часто встречающегося на территории СССР.

Клоны бактерий, несущие кДНК вируса ящура, были получены молекулярным клонированием фрагментов кДНК, синтезированных на вирионной РНК с помощью обратной транскриптазы из вируса миелобластоза штиц. Для отбора клонов, содержащих последовательность кДНК, кодирующую белок VP1, использовали гибридизацию колоний с радиоактивными зондами [1]. В качестве зондов применяли олигонуклеотиды, соответствующие консервативным областям нуклеотидной последовательности генов VP3 и p52 соответственно вблизи проксимального и дистального концов гена VP1. Эти консервативные участки были выявлены в результате сравнения первичных структур РНК штаммов A<sub>12</sub> [2], A<sub>10</sub> [3], O<sub>1</sub>К [4]. Для анализа был отобран клон, содержащий последовательность кДНК вируса ящура от дистального конца гена VP3 до гена VP<sub>g</sub>. С целью определения положения кДНК этого клона на геноме вируса была расшифрована первичная структура концов вставки, а также определена карта расщепления ее некоторыми рестриктазами. В результате было установлено, что область, кодирующая ген белка VP1, целиком расположена внутри фрагмента HaeIII. Схема его секвенирования изображена на рис. 1. Установленная нуклеотидная последовательность фрагмента в форме позитивной цепи и выведенная из нее аминокислотная последовательность белка показаны на рис. 2.

В иммунохимическом плане наибольшее значение имеет последовательность аминокислот в областях антигенных детерминант. Сравнение этих районов молекулы белка VP1 вируса A<sub>22</sub> с последовательностями белков VP1 других вирусов ящура серотипа А показало, что белок вируса ящура A<sub>22</sub> значительно отличается от всех ранее опубликованных структур. Так, в области основной антигенной детерминанты (аминокислоты 131–171) уровень гомологии не превышает 60–70% (рис. 3), а в районе N-концевой (43–46) и C-концевой (192–193) детерминант составляет всего 0–50%.

Выяснение нуклеотидной последовательности участка кДНК, кодирующего белок VP1, позволяет направлению конструировать продуценты вакцинальных препаратов генно-инженерными методами. Расположение уникальных мест расщепления рестриктазами обеспечивает достаточно простой перенос в любой вектор с высоким уровнем экспрессии как целиком гена белка VP1 (фрагменты PstI-XmaI, MspI-MspI, MspI-HaeIII), так и его отдельных участков, например кодирующих основную антигенную детерминанту (фрагменты KpnI-XmaI, BstEII-XmaI).

В работах с использованием синтетических пептидов показано, что фрагмент аминокислотной последовательности 140–160 белка VP1 обладает большей иммуногенностью, чем целый белок [8]. Препаративный химический синтез такого пептида затруднителен. В то же время уникальное расположение остатков метионина в белке вируса A<sub>22</sub> позволяет достаточно просто, химическим гидролизом, вырезать из продукта экспрессии фрагмент 142–178 с его последующей хроматографической очисткой.

Авторы выражают благодарность В. А. Петренко и Г. Ф. Сиволовой за синтез олигонуклеотидных зондов, а также Т. И. Калашниковой и С. Х. Дегтяреву за помощь в работе.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрюк Дж. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984, с. 137.
2. Kleid D., Yansura D., Small B., Dowbenko D., Moore D., Grubman M., McKercher P., Morgan D., Robertson B., Bachrach H. Science, 1981, v. 241, № 4525, p. 1125–1128.
3. Bothroyd J., Harris T., Rowlands D., Lowe P. Gene, 1982, v. 17, № 2, p. 153–161.
4. Kurz C., Forss S., Kupper H., Strohmaier K. Nucl. Acids Res., 1981, v. 9, № 8, p. 1919–1931.
5. Cheung A., Whitehead P., Weiss S., Kupper H. Gene, 1984, v. 30, № 1/2/3, p. 241–245.

6. Beck E., Feil G., Strohmaier K. EMBO J., 1983, v. 2, № 3, p. 555–559.
7. Makoff A., Paynter C., Rowlands D., Bothroyd J. Nucl. Acids Res., 1982, v. 10, № 24, p. 8285–8295.
8. Bittle J., Houghten R., Alexander H., Shinnick T., Sutcliffe J., Lerner R. Nature, 1982, v. 298, № 5863, p. 30–33.
9. Maxam A. M., Gilbert W. G. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1977, v. 74, № 2, p. 560–564.

Поступило в редакцию  
10.VII.1985

## THE DNA-COPY PRIMARY STRUCTURE FOR THE GENE OF THE FMDV A<sub>22</sub> SEROTYPE VP1-PROTEIN

ONISHCHENKO A. M., PETROV N. A., BLINOV V. M.,  
VASSILENKO S. K., SANDAKHCHIEV L. S., BURDOV A. N.\*,  
IVANYUSHCHENKOV V. N.\*, PEREVOZCHIKOVA N. A.\*

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

*\* All-Union FMDV Research Institute, Vladimir*

The DNA-copy of the major antigen (VP1) coding region of the FMDV A<sub>22</sub> serotype has been cloned and sequenced. A comparison of the respective amino acid sequence with those of other VP1 of A-serotype revealed considerable differences in the structure of antigenic determinants.