



УДК 577.113.5:578.832.1А

ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА ПОЛНОРАЗМЕРНОЙ ДНК-КОПИИ
ГЕНА БЕЛКА РВ2 ВИРУСА ГРИППА А/КИЕВ/59/79 (Н1N1)

*Петров Н. А., Нетесов С. В., Головин С. Я.,
Мамаева Н. В., Мамаев Л. В., Сиволобова Г. Ф.,
Петренко В. А., Василенко С. К.*

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

Определена полная первичная структура гена РВ2 вируса гриппа А/Киев/59/79 — природного реассортанта по генам кора с современными ему вирусами подтипа Н3N2.

Транскрипция генома вируса гриппа происходит в клеточном ядре при участии комплекса вирусных белков РВ1, РВ2 и РА [1, 2]. Белок РВ2 связывается со вновь синтезированными клеточными мРНК, снабженными «кэпом» ($m^7GpppNm$), и при участии белков РВ1 и РА отрывает от них короткий 5'-концевой фрагмент, используемый как затравка при транскрипции вирусных мРНК [3–5]. РВ2 кодируется сегментом 1 генома вируса гриппа, из которого образуется большинство укороченных субгеномных РНК [6–8], являющихся одним из факторов регуляции вирулентности вируса гриппа [9]. Показано также, что замена гена белка РВ2 в реассортантном геноме может изменить круг хозяев вируса [10].

Настоящая работа посвящена определению первичной структуры полноразмерной ДНК-копии гена белка РВ2 вируса гриппа А/Киев/59/79, антигенного подтипа Н1N1. Расшифрованная первичная структура гена размером 2341 нуклеотид приведена на рисунке в форме позитивной цепи вместе с соответствующей ей аминокислотной последовательностью белка РВ2. Нуклеотидная последовательность установлена в результате анализа ДНК из двух клонов, один из которых содержал копию участка 1–1095 нуклеотидов с 5'-конца позитивной цепи, а второй — полноразмерную ДНК-копию гена РВ2 (клон 3–59). Таким образом, 30% структуры определено по двум независимым клонам кДНК. При этом обнаружен один различающийся в двух клонах нуклеотид в положении 932 с 5'-конца позитивной цепи, что может быть обусловлено ошибкой обратной транскриптазы. Более $\frac{2}{3}$ последовательности нуклеотидов ДНК-копии гена было установлено по двум комплементарным цепям.

При сравнении гена РВ2 штамма А/Киев/59/79 с соответствующими генами штаммов А/NT/60/68 [11], А/PR/8/34 [12], А/WSN/33 [13] и А/FPV/Rostock/34 [14] (см. рисунок) выяснилось, что он наиболее близок к гену вируса А/NT/60/68 (подтипа Н3N2) и значительно отличается от остальных. Это обстоятельство подтверждает наш вывод о том, что вирус А/Киев/59/79 является естественным реассортантом, «позаимствовавшим» от современных ему вирусов подтипа Н3N2 некоторые гены белков кора [15].

Экспериментальная часть

Для получения ДНК-копий генов вируса А/Киев/59/79 был использован его высокоурожайный реассортант со штаммом А/PR/8/34, полученный во ВНИИ гриппа (Ленинград) и в течение ряда лет применявшийся в СССР для массовой вакцинации в форме инактивированной вакцины. Подробные методики очистки вируса, выделения РНК, получения кДНК, клонирования и определения первичной структуры химическим методом [16] приведены в нашей предыдущей работе [17]. В данном случае полученная высокомолекулярная кДНК после дестройки олиго-С-концов с помощью дезоксирибонуклеотидилтрансферазы подвергалась электрофорезу в ПААГ. ДНК из области геля, соответствующей фрагментам размером 2000–3000 нуклеотид-

M E R Y K E L R N L M

1 AGCAAAAAGCAGGTCAATTATATTCAGTATGGAAAGAATAAAAAGAACTACGGAACCTGATG 60
2 AC T
3 A A G A AG TT A
4 A A T A
5 A A T A

S Q S R T R E I L T K T T V D H M A I I

1 TCGCAGTCTCGCACTGCGGAGATACTGACAAAAACCCACAGTGGACCATATGGCCATAATT 120
2 A T
3 G C C C C C
4 C C C C C
5 C C C C C

K K Y T S G R Q E K N P S L R M K W M M

1 AAGAAGTACACATCAGGGAGACAGGAAAAGAACCCTGACTTAGGATGAAATGGATGATG 180
2 T
3 A C A G T G C C A
4 A A G AG
5 A A G AG

A M K Y P I T A D K R I T E M I P E R N

1 GCAATGAAATATCCAATTACAGCTGACAAAAGGATAACAGAAATGATTCCGGAGAGAAAT 240
2 G G T
3 C C A G TG T A AG
4 A G G T
5 A G G T

E Q G Q T L W S K M S D A G S D R V M V

1 GAGCAAGGACAAAACCTATGGAGTAAAATGAGTGTGCCGGTCCAGATCGAGTGTGTTA 300
2 T C A
3 A G G G C CA A T C G A
4 G TT A C A C
5 TT A A C

S P L A V T W W N R N G P V T S T V H Y

1 TCACCTTTGGCAGTGACATGGTGGAAATAGAAATGGACCAGTGACAAGTACGGTTCATTAT 360
2 C A
3 C T T A C G ACA A C C
4 C T G A A
5 C T G A A A

P K Y Y K T Y F D K V E R L K H G T F G

1 CCAAAAGTCTACAAGACTTATTTTGATAAAAGTCGAAAAGGTTAAAACATGGAACCTTTGCC 420
2 G
3 G T CA C G A T G G C
4 A A A A
5 A A A G C G

P V H F R N Q V K I R R R V D I N P G H

1 CCTGTCCATTTTAGGAATCAAGTCAAGATACGCCGAAGAGTAGACATAAACCCCTGGTCAT 480
2 A C A T
3 C CC A C A T C G T T C
4 A C A T T T
5 A C A T G T T

A D L S A K E A Q D V I M E V Y F P N E

1 GCAGACCTCAGTGCCAAGGAGGCACAAGATGTAATCATGGAAGTGTGTTTCCCAATGAA 540
2
3 A T T A C G C A
4 T A G T C
5 T G T C

V G A R I L T S E S Q L T I T K E K K E

1 GTGGGGCCAGAATACTAACCCTCGGAATCACARTTAACAATAACCAAAGAGAAAAAGAA 600
2
3 A G A A A G A G G
4 A G A G C G C G
5 A G A G C G

E L Q D C K I S P L M V A Y M L E R E L 660
 1 GAAC1CCAAGATTGCCAAAATTTCTCCTTTGATGGTTGCATACATGTTAGAGAGAGAAGCTT
 2
 3 T G C T G C C A AG G A G
 4 G G C G G G
 5 G G G

V R K T R F L P V A G G T S S M Y I E V 720
 1 GTCCGAAAAACGAGATTTCTCCAGTTGCTGGTGGAAACAAGCAGTATGTACAT1GAAGTG
 2 G A C
 3 F G G C G A A G A C A
 4 C C C G G G
 5 C C G G

L H I T Q G I C W E Q M Y T P G G E V R 780
 1 TTGCATTTGACTCAAGGAACGTGTGGGAACAGATGTACACTCCAGGCCGAGAAGT1GAGG
 2 A C T
 3 G C C A T A
 4 C C A C A G G C A
 5 A C T A G A

N D P V D Q S L I I A A R N I V R R A A 840
 1 AATGACCGATGTTGACCAAAGCCTAATTATTGCAGCCAGGAACATAGTGAGAAGAGCCGCCA
 2 T T A
 3 C T T G I G C T T A T G A A
 4 T T T T T A A A
 5 T T I G T T T

V S A D P L A S L L E M C H S T Q I G G 900
 1 GTFT1CAGCAGATCCACTAGCATCTTTATTGGAGATGTGCCACAGCACACAATTTGGCGGG
 2 A G
 3 G C G A C G T T T
 4 G G G G T A
 5 A C G G T A

T R M V D T L R Q N P T E E Q A V D I C 960
 1 ACAAGGATGGTGGACATTTCTTAGGCAGAACCCGACGGGAAGAACAAGCTGTGGATATATGC
 2 T A A
 3 T A A C A A T A C
 4 T AA C A A G C T
 5 TT A C A A A G C G

K A A M G L R I S S S F S F G G F T F K 1020
 1 AAGGCTGCAA1GGGACTGAGAATCAGCTCATCCTTCAGTTTTGGTGGGTTACATTTAAA
 2 A G C A G
 3 G TT G C A C T C
 4 T T A A G
 5 T A G

R T S G S S I K R E E E V L T G N L Q T 1080
 1 AGAACAAAGCGGGTCTCAATCAAAGAGAGGAAGAAGTCTTACAGGCCAATCTCCAAAACA
 2 A G T G
 3 T A A TG C GA A G G C
 4 A A G G G G T G
 5 A A G G G G T

L K I R V H E G Y E E F T M V G K R A T 1140
 1 TTGAAAATAAGGGTGCATGAGGGGTATGAGGAGTTACAAATGGTGGGAAAAAGGGCAACA
 2 A T C A
 3 C A A A A A A T CGG A
 4 G A A A A A T G A
 5 G A A A A T G A

A I L R K A T R R L V Q L I V S G R D E 1200
 1 GCTATAGTCAGAAAAGCAACCAGGAGATTGGTTCAGCTTATAGTGACTGGAAGGGACGAA
 2 G A
 3 C A G A GC A G A
 4 A A G G G A
 5 C A G G A

Q S I A E A I I V A M V F S Q E D C M I
 1 CAGTCAATAGCCGAAGCAATAAT1GTAGCCATGGTGT1TTCACAAGAGGATTGCATGATA 1260
 2 G A
 3 C T G C G A T
 4 G T G A T
 5 G T G A T

K A V R G D L N F V N R A N Q R L N P M
 1 AAAGCAGTTAGAGGTGACCTGAATTTCCGTTAACAGGGCAAATCAGCGGT1GAAATCCCATG 1520
 2 T A
 3 CC T C G A G C C
 4 C T G A C
 5 T C T G AC T

H Q L L R H F H K D A K V L F Q N W G I
 1 CATCAACTTTTAAGGCATTTTCATAAAGATGCCAAAAGTGCTTTTTCAGAATTGGGGAATT 1380
 2 G A
 3 C G A C C A A AC T A A G
 4 C G A G G A G C C A A
 5 A G G A A G

E H I D S V M G M V G V L P D M T P S T
 1 GAACATATCGACAGTGTGATGGGAATGGTGGAGTATTACCAGACATGACTCCGAGCACA 1440
 2 A A G A A
 3 CC T A C A A A T
 4 TCC A A A C GA G C A C
 5 C A A A CA G C A TC

E M S M R G I R V S K M G V D E Y S S T
 1 GAGATGTCAATGAGAGGAATAAGAGTCAAGAAAATGGGCGTGGATGAATACTCCAGCACA 1500
 2
 3 GC GG G G T G A T C
 4 GG G A G A G T G G
 5 G G A T A G G

E K V V V S I D R F L R V R D Q R G N V
 1 GAGAAGG1GGTGGTTAGCATTGATCGGTTTTTGAGACTTCGAGACCAAGCTGGGAATGTA 1560
 2 G T G C C A A A G
 3 GA C G T C T C A T G A
 4 A A G C T A G A A
 5 G A G C C C G A A

L L D P E E V S E T O G T E R L T I T Y
 1 TTACTATCTCCTGAGGAGTCACTGAAACACAGGGGACAGAGACTGACAATAACTTAC 1620
 2 A
 3 A C G A T C G A AGT C A T
 4 C G C A A A
 5 C G C A A

S S S M M W E I N G P E S V L V N T Y O
 1 TCATCGTCAATGATGTGGGAGATTAATGGCCCTGAGTCACTGGTCAATACCTATCAA 1680
 2 G
 3 A A C A T
 4 T A G
 5 T A A

W I I R N W E T V K I Q W S Q N P T M L
 1 TGGATCATCAGAAACTGGGAAACTGTTAAAATTCATGGTCTCAGAATCCTACAATGTTG 1740
 2 C A
 3 T G G G G C GTC G CAC A
 4 G C C C
 5 G C C C A

Y N K M E F E P F O S L V P K A I R G Q
 1 TACAACAAAATGGAAATTTGAACCATTTCACTTTAGTTCCTAAGGCCAATTAGAGGCCAA 1800
 2 G
 3 G T C C G A TGCC
 4 T G A A G
 5 T A A

Y S G F V R I L F Q Q M R D V L G T F D
 1 TACAGTGGATTGTGAGAACTCTATTCCAACAAATGAGGGATGTACTTGGGACATTTGAT 1860
 2 T G
 3 G G A G G C T C T C C
 4 G G G G G
 5 G G G G

T T Q I T K L L P F A A A P P K Q A R M
 1 ACCACCCAGATAAIAAAGCTTCTCCCTTTTGCAGCCGCCCCACCAAAGCAAAGCAGAATG 1920
 2 C T G
 3 ACTT A I G T C G GG G T G
 4 G I A T C C TG
 5 G T A T C C T T

Q F S S L I V N V R G S G M R I L V R G
 1 CAGTTCCTTTCATTGACTGTGAATGTGAGGGGATCAGGGATGAGAATACTTGTAAAGGGGG 1980
 2
 3 A T C A A A G A G A T
 4 C C A A A
 5 C T A

N S P V F N Y N K T T K R L T I L G K D
 1 AATTCCTGTGATTCAACTACAACAAGACCACATAAAAGACTAACAATTCGCGAAAAGAT 2040
 2 C A G
 3 C T T G A C G G T G C G G C
 4 AA A C G C G
 5 G G G C G G

A G T L I E D P D E S T S G V E S A V L
 1 GCTGGCACTTTAATTGAAGACCCAGATGAAAGCACATCCGGAGTGGAGTCCCGCTGTTTTG 2100
 2 G T A C
 3 G T G G C A G G G T A T
 4 C C G G T T A C
 5 C C G G T C

R G F L I L G K E D R R Y G P A L S I N
 1 AGAGGATTTCTCATTCTAGGTAAGGGAGATAGAAGATACGGACCAGCATTAAAGCATTAAAT 2160
 2 G C G T C
 3 G A G C A C A T G C
 4 C G C A C G T A
 5 G C G C A C G T G C

E L S N L A K G E K A N V L I G Q G D V
 1 GAACTGAGTAACCTTGGCGAAAGGAGAAAAGGCTAATGTGCTAATGGGCAAGGACACGTG 2220
 2 A A
 3 C T G G A C T A
 4 C G
 5 C G

V L V M E E K R D S S I L T D S Q T A T
 1 GTGTTGGTAATGAAACCAAAACGGGACTCTAGCATACTTACTGACAGCCAGACAGCGACC 2280
 2
 3 G
 4 G A
 5

K R I R M E I N
 1 AAAAGAATTCGGATGCGATCAATTAATGTTGAATACTTTAAAAACGACCTTCTTTCTACT 2341
 2
 3 C T
 4 G C
 5 G C

Последовательность нуклеотидов ДНК-копии гена PB2 вируса гриппа А/Киев/59/79 в форме позитивной цепи (строка 1) и выведенная из нее аминокислотная последовательность белка. В строках 2-5 приведены отличающиеся остатки в структурах генов PB2 штаммов: 2 - А/NT/60/68 [11], 3 - А/FPV/Rostock/34 [14], 4 - А/WSN/33 [13], 5 - А/PR/8/34 [12]

ных пар, электроэлюировали и клонировали. Отбор клонов, содержащих копии гена PB2, производили по результатам гибридизации колоний с синтезированным олигонуклеотидным зондом, комплементарным участку 805-819 с 3'-конца негативной цепи гена PB2 штамма A/NT/60/68.

Авторы выражают благодарность Б. Г. Гриненкову за содействие в обеспечении впусным материалом, С. Х. Дегтяреву и Н. А. Нетесовой за предоставление высокоочищенных экспериментальных препаратов рестриктаз.

ЛИТЕРАТУРА

1. Herz C., Stavnezer E., Krug R. M., Gurney T. // *Cell*. 1981. V. 26. № 3. P. 391-400.
2. Smith G. L., Hay A. J. // *Virology*. 1982. V. 118. № 1. P. 96-108.
3. Braam J., Ulmanen J., Krug R. // *Cell*. 1983. V. 34. № 2. P. 609-618.
4. Ulmanen J., Broni B. A., Krug R. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1981. V. 78. № 12. P. 7355-7359.
5. Blaas D., Patzelt E., Kuchler E. // *Nucl. Acids Res.* 1982. V. 10. № 15. P. 4803-4812.
6. Jennings P. A., Finch J. T., Winter G., Robertson J. S. // *Cell*. 1983. V. 34. № 2. P. 619-627.
7. Davis A., Hiti A., Nayak D. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1980. V. 77. № 1. P. 215-219.
8. Winter G., Fields S., Ratti G. // *Nucl. Acids Res.* 1981. V. 9. № 24. P. 6907-6915.
9. Голубев Д. В. // *Итоги науки и техники. Сер. Вирология*. 1985. Т. 11. С. 110-136.
10. Scholtissek C., Murphy B. R. // *Arch. Virol.* 1978. V. 58. № 1. P. 323-333.
11. Jones K. L., Huddlestone J. A., Brownlee G. G. // *Nucl. Acid Res.* 1983. V. 11. № 5. P. 1555-1566.
12. Fields S., Winter G. // *Cell*. 1982. V. 28. № 2. P. 303-313.
13. Kaptein J. S., Nayak D. P. // *J. Virol.* 1982. V. 42. № 1. P. 55-63.
14. Roditi I. J., Robertson J. S. // *Virus Res.* 1984. V. 1. № 1. P. 65-71.
15. Беклемишев А. Б., Блинов В. М., Василенко С. К., Головин С. Я., Каргинов В. А., Мамаев Л. В., Нетесов С. В., Петров Н. А., Сафронов П. Ф. // *Биоорг. химия*. 1986. Т. 12. № 3. С. 369-374.
16. Maxam A. M., Gilbert W. G. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1977. V. 74. № 2. P. 560-564.
17. Беклемишев А. Б., Блинов В. М., Василенко С. К., Головин С. Я., Гугоров В. В., Каргинов В. А., Мамаев Л. В., Микрюков Н. Н., Нетесов С. В., Петренко В. А., Петров Н. А., Саудагчиев Л. С. // *Биоорг. химия*. 1984. Т. 10. № 11. С. 1535-1543.

Поступила в редакцию
31.VII.1986
После доработки
20.XI.1986

NUCLEOTIDE SEQUENCE OF A FULL-LENGTH DNA COPY OF THE INFLUENZA VIRUS A/KIEV/59/79 (H1N1) PB2 GENE

PETROV N. A., NETESOV S. V., GOLOVIN S. Ya., MAMAIEVA N. V.,
MAMAIEV L. V., SIVOLODOVA G. F., PETRENKO V. A., VASILENKO S. K.

*All-Union Research Institute of Molecular Biology, Koltzovo,
Novosibirsk Region*

The complete nucleotide sequence of a cloned full-length DNA copy of the A/Kiev/59/79 (H1N1) influenza virus PB2 gene has been determined. This strain is shown to be the natural reassortant which inherited its NP and PB2 genes from the contemporary H3N2 influenza strains.