



УДК 578.2'21.082.261

© 1990 г.

*И. Н. Бессараб, И. А. Повикова, А. М. Бородин **

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ
ДЛЯ АНАЛИЗА РОТАВИРУСОВ. НУКЛЕОТИДНАЯ
ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ГЕНА, КОДИРУЮЩЕГО ОСНОВНОЙ
НЕЙТРАЛИЗУЮЩИЙ АНТИГЕН VP7 РОТАВИРУСА ЧЕЛОВЕКА
НОВОГО G-СЕРОТИПА**

Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии МЗ РСФСР,
г. Горький;

* Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР, Москва

Ротавирусы (сем. *Reoviridae*) — основные возбудители инфекционных гастроэнтеритов. Геном ротавирусов состоит из 11 сегментов двуцепочечной РНК с молекулярной массой $(0,2-2,2) \cdot 10^6$ Да [1].

Защита от ротавирусов обусловлена секреторными антителами, направленными против антигенных детерминант двух поверхностных белков: VP4 и VP7 [2]. G-Серотип вируса определяет гликопротеин VP7 (35 000 Да) — продукт гена, локализованного на сегментах 7, 8 или 9, в зависимости от штамма ротавируса [2, 3]. Накопление данных относительно структуры этого белка необходимо для надежной идентификации ротавирусов и создания эффективной вакцины.

Цель данной работы — разработка чувствительной системы выявления ротавирусов, позволяющей последующее изучение их антигенных свойств. Для этого был использован метод полимеразной цепной реакции (PCR) [4], который уже нашел применение для детекции различных вирусов. В частности, применение PCR для выявления вируса гепатита В дало 10000-кратное увеличение чувствительности по сравнению со стандартными методами [5].

В работе был использован штамм RK9 ротавируса человека, выделенный в 1985 г. в г. Куйбышеве. Этот штамм имеет необычный профиль миграции сегментов РНК в полиакриламидном геле и ранее был отнесен к «широкому» электрофоретипу [6]. Поскольку имеются данные о корреляции электрофоретипа ротавирусов с антигенными свойствами [7], изучение структуры белка VP7 штамма RK9 представляло особый интерес.

кДНК получали при помощи AMV * обратной транскриптазы на основе ротавирусной РНК, выделенной из 50 мкл 10 % вирусной суспензии [6]. Для синтеза кДНК и амплификации (PCR) гена VP7 использовали праймеры 5'-ATGTATGGTATTGAATATAC-3' и 5'-GGTCACATCATACAATTCTA-3', синтезированные на основе последовательности гена VP7 штамма SA11 [8] и комплементарные консервативным участкам гена VP7 различных ротавирусов. PCR (30 циклов) проводили в следующем режиме: денатурация при 95°С в течение 30 с; отжиг при 55°С в течение 1 мин; элонгация цепи при 70°С в течение 9 мин. Реакционная смесь (50 мкл) содержала 70 мМ трис-HCl (pH 8,8); 16,6 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 6,7 мМ MgCl_2 ; 10 мМ β-меркаптоэтанол; 6,7 мМ EDTA; 500 мкмоль dNTP; 50 пмоль каждого праймера; 1—3 ед. акт. ДНК-полимеразы *Taq*.

Продукт амплификации (фрагмент ДНК 1014 п. о., включающий в себя структурную часть и 3'-нетранслируемую область гена VP7) клониро-

* Вирус миеобластома птиц.

ATG TAT GGT ATT GAA TAT ACC ACA ATT CTA ACC TTT TTG ATA TCG CTT ATA TTT ATA AAT	30	60
Met Tyr Gly Ile Glu Tyr Thr Thr Ile Leu Thr Phe Leu Ile Ser Leu Ile Phe Ile Asn		
TAT ATA TTT AAA ACA ATC ACC AGT ACG ATG GAC TTT ATC ATC TAC AGA TTT CTG TTT GTT	90	120
Tyr Ile Phe Lys Thr Ile Thr Ser Thr Met Asp Phe Ile Ile Tyr Arg Phe Leu Phe Val		
ATG GTT GTA TTG CCA CCA TTT GTT AAA ACG CAA AAT TAT GGA GTA AAT TTG CCA ATA ACT	150	180
Met Val Val Leu Pro Pro Phe Val Lys Thr Gln Asn Tyr Gly Val Asn Leu Pro Ile Thr		
GGT TCC ATG GAT ACG CCA TAT ATA AAT TCA ACA GTA AGT GAA TCA TTT TTA ACT TCT ACT	210	240
Gly Ser Met Asp Thr Pro Tyr Ile <u>Asn Ser Thr</u> Val Ser Glu Ser Phe Leu Thr Ser Thr		
CTA TGT ATA TAT TAT CCA AAC GAC GTA ACG AAC CAG ATC ACA GAT AAT AAA TGG AAA GAT	270	300
Leu Cys Ile Tyr Tyr Pro Asn Asp Val Thr Asn Gln Ile Thr Asp Asn Lys Trp Lys Asp		
ACT CTT TCA CAG CTA TTT CTT ACT AAA GGG TGG TCA ACA GGT TCA GTT TAC TTT AAA GAA	330	360
Thr Leu Ser Gln Leu Phe Leu Thr Lys Gly Trp Ser Thr Gly Ser Val Tyr Phe Lys Glu		
TAT GCA GAT CTC GCG TCA TTT TCT GTA AAT CCA CGC CTA TAT TGT GAT TAT AAC ATT GTG	390	420
Tyr Ala Asp Leu Ala Ser Phe Ser Val Asn Pro Arg Leu Tyr Cys Asp Tyr Asn Ile Val		
TTG ATG AAA TAT GAT GGA AAT TCA CAA CTA GAT ATG TCT GAA TTG GCT GAC TTA ATA TTA	450	480
Leu Met Lys Tyr Asp Gly Asn Ser Gln Leu Asp Met Ser Glu Leu Ala Asp Leu Ile Leu		
AAT GAA TGG TTG TGT AAT CCA ATG GAT GTT AAA CTC TAT TAT TAC CAA CAA ACA GAT GAA	510	540
Asn Glu Trp Leu Cys Asn Pro Met Asp Val Lys Leu Tyr Tyr Tyr Gln Gln Thr Asp Glu		
GCA AAT AAA TGG ATA TCA ATG GGC GAC TCG TGT ACA ATT AAA GTA TGT CCA CTC AAT TCA	570	600
Ala Asn Lys Trp Ile Ser Met Gly Asp Ser Cys Thr Ile Lys Val Cys Pro Leu Asn Ser		
CAG ACT CTT GGA ATC GGA TGT TCG ACT ACT GAC CCA ACA ACA TTT GAA GAA GTA GCT TCT	630	660
Gln Thr Leu Gly Ile Gly Cys Ser Thr Thr Asp Pro Thr Thr Phe Glu Glu Val Ala Ser		
ATA GAG AAA TTA GTG ATA ACT GAC GTT GTA GAT GGA ATT AAT CAT AAA TTA GAT GTC ACA	690	720
Ile Glu Lys Leu Val Ile Thr Asp Val Val Asp Gly Ile Asn His Lys Leu Asp Val Thr		
ACC GCT ACA TGT ACA ATT AGG AAC TGT AAA AAA CTT GGA CCA AGA GAA AAC GTT GCA ATA	750	780
Thr Ala Thr Cys Thr Ile Arg Asn Cys Lys Lys Leu Gly Pro Arg Glu Asn Val Ala Ile		
ATT CAA GTA GGA GGG TCA AAT ATA CTC GAT ATT ACA GCA GAT CCA ACC ACA GCT CCA CAA	810	840
Ile Gln Val Gly Gly Ser Asn Ile Leu Asp Ile Thr Ala Asp Pro Thr Thr Ala Pro Gln		
ACT GAA AGA ATG ATG CGT ATA AAT TGG AAA AAA TGG TGG CAG GTA TTT TAT ACT ATA GTG	870	900
Thr Glu Arg Met Met Arg Ile Asn Trp Lys Lys Trp Trp Gln Val Phe Tyr Thr Ile Val		
GAT TAT GTT AAC CAA ATC GTA CAA GTA ATG TCC AAG CGA TCT CGT TCT TTA AAT TCC GCT	930	960
Asp Tyr Val Asn Gln Ile Val Gln Val Met Ser Lys Arg Ser Arg Ser Leu Asn Ser Ala		
GCT TTT TAT TAT CGG GTT TAG ATA TAT CTT AAG TTA GAA TTG TAT GAT GTG ACC	990	
Ala Phe Tyr Tyr Arg Val End		

Рис. 1. Нуклеотидная последовательность гена VP7 и соответствующая ей аминокислотная последовательность белка VP7. Потенциальный сайт гликозилирования подчеркнут

вали в плазмидном векторе pGEM 3Z (Promega) по *Sma*I-сайту. После обработки полученных рекомбинантных плазмид рестриктазами *Eco*RI и *Bam*HI фрагмент, содержащий полноразмерный ген VP7, был клонирован в двух ориентациях в фаговых векторах — M13mp10 и M13mp11. Нуклеотидные последовательности нескольких независимых клонов определяли по методу Сэнгера [9, 10].

Белок VP7 штамма RK9 состоит из 326 аминокислотных остатков и содержит один потенциальный сайт N-гликозилирования (Asn⁶⁹-Ser-Thr⁷¹) (рис. 1). Этот сайт консервативен для белка VP7 всех ротавирусных штаммов, за исключением NCDV (серотип G6) [11]. Особенностью первичной структуры белка VP7 штамма RK9 является замена остатка про-

		A		C	
Штамм		87	100	208	221
RK9	(10)	NDVTNQITDNKWKD		STTDPTTFEEV ASI	
WA	(1)	TEAST..N.GD...		Q..NVDS..MI.EN	
DS1	(2)	AEAK.E.S.DE.EN		K...VN...I...S	
P	(3)	TEAATE.N..S...		L...TN.....TA	
ST3	(4)	SEAPT..S.TE...		Q..NTA...T..DS	
OSU	(5)	.EAATE.A.T..TE		INS..T..NA	
NCDV	(6)	VEAS.E.A.TE...		LI.N.D...T..TM	
69M	(8)	VEAETE.A.SS...		L...T.....TA	
F45	(9)	AEAST..G.TE...		T..NTA.....AS	

Рис. 2. Сравнение аминокислотных последовательностей дивергентных районов А (аминокислотные остатки 87—100) и С (аминокислотные остатки 208—221) гликопротеина VP7 ротавирусов различных G-серотипов [7, 11, 14, 12]. Серотип штамма указан в скобках. Совпадающие аминокислотные остатки обозначены точками

лина в положении 112, консервативного во всех известных последовательностях, на остаток серина.

Гликопротеин VP7 содержит 9 участков, варьируемых среди различных серотипов и консервативных внутри одного серотипа [11, 12]. Нейтрализующие эпитопы — районы А, В и С [7, 13]. У ротавирусов одного серотипа районы А и С содержат не более двух аминокислотных замен [11, 12]. Сравнение первичной структуры белка VP7 штамма RK9 и структур белков VP7 всех известных серотипов выявило в этих районах от 4 до 10 аминокислотных замен (рис. 2).

Уникальная структура белка VP7 штамма RK9 в участках, определяющих антигенные свойства, указывает на то, что этот штамм — представитель нового (G12) серотипа ротавирусов.

Авторы признательны С. М. Грязнову за синтез олигонуклеотидов, использованных в работе.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kalica A., Wyatt R., Kapikian A. // J. Amer. Med. Assoc. 1978. V. 173. № 3. P. 531—537.
2. Nagesha H. S., Huang J., Holmes I. H. // Virology. 1990. V. 175. № 1. P. 319—322.
3. Greenberg H. B., Valdesuso I., Van Wyke K., Mudthun K., Walsh M., McAuliffe V., Wyatt R. G., Kalica A. R., Flores J., Hoshino Y. // J. Virol. 1983. V. 47. № 1. P. 267—275.
4. Saiki R. K., Gelfand D. H., Stoffel S., Scharf S. J., Higuchi R., Horn G. T., Mullis K. B., Erlich H. A. // Science. 1988. V. 239. № 4839. P. 487—491.
5. PCR technology: principles and applications for DNA amplification / Ed. H. A. Erlich. N. Y.: Stockton Press, 1989. P. 235—244.
6. Новикова Н. А., Анцупова А. С., Епифанова Н. В., Альтова Е. Е., Троицкая М. В. // Молекуляр. генетика, микробиология и вирусология. 1989. № 5. С. 45—49.
7. Hum C. P., Dyall-Smith M. L., Holmes I. H. // Virology. 1989. V. 170. № 1. P. 55—61.
8. Both G. W., Mattick J. S., Bellamy A. R. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1983. V. 80. № 10. P. 3091—3095.
9. Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1977. V. 74. № 12. P. 5463—5467.
10. Бородин А. М., Данилович А. В., Чернов И. П., Ажикина Т. Л., Ростаншов В. М., Монастырская Г. С. // Бюоган. химия. 1988. Т. 14. № 9. С. 1179—1182.
11. Green K. Y., Hoshino Y., Ikegami N. // Virology. 1989. V. 168. № 2. P. 429—433.
12. Green K. Y., Sears J. F., Taniguchi K., Midthun K., Hoshino Y., Gorziglia M., Nishikawa K., Urasawa S., Kapikian A. Z., Chanock R. M., Flores J. // J. Virol. 1988. V. 62. № 5. P. 1819—1823.
13. Dyall-Smith M. L., Lazdins I., Tregear G. W., Holmes I. H. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1986. V. 83. P. 3465—3468.
14. Nishikawa K., Hoshino Y., Taniguchi K., Green K. Y., Greenberg H. B., Kapikian A. Z., Chanock R. M., Gorziglia M. // Virology. 1989. V. 171. P. 503—515.

Поступило в редакцию
26.VI.1990

USE OF POLYMERASE CHAIN REACTION FOR ANALYSIS
OF ROTAVIRUS. NUCLEOTIDE SEQUENCE OF THE GENE CODING
FOR MAJOR NEUTRALIZATION ANTIGENE VP7 OF A NEW HUMAN
ROTAVIRUS G SEROTYPE

*Institute of Epidemiology and Microbiology, Ministry of Public
Health of the RSFSR, Gorkiy;*

** M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy
of Sciences of the USSR, Moscow*

A procedure based on polymerase chain reaction use for the detection of rotavirus has been developed. Full length cDNA copy of the VP7 gene coding for the major neutralization glycoprotein of the human rotavirus RK9 with an unusual «wide» electrophoretic type is cloned and sequenced. Glycoprotein VP7 of RK9 has a unique amino acid composition in A and C antigenic regions. It shows that strain RK9 represents a new (12) rotavirus serotype.