



ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 575.113 : 577.113.5

КЛОНИРОВАНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ ПЕРВИЧНОЙ СТРУКТУРЫ
ДНК-КОПИЙ УЧАСТКОВ ГЕНОМА ВИРУСА
КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА*Чумаков М. П., Бусов Ю. Ю., Рубин С. Г.**
*Сальников Я. А., Семашко И. В.**Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов
Академии медицинских наук СССР, Москва**Георгиев Г. П., Чумаков П. М.**Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва**Грачев М. А., Шаманин В. А., Шлетнев А. Г.***Новосибирский институт органической химии
Сибирского отделения Академии наук СССР*

Вирус клещевого энцефалита (вирус КЭ) относится к семейству *Togaviridae*, род флавивирусов, геном которых представляет собой одноцепочечную РНК длиной около 12 000 нуклеотидных звеньев (н.з.) [1]. Вирионная РНК флавивирусов выполняет функции информационной. В отличие от РНК отчасти родственных альфа-вирусов она, по-видимому, содержит несколько точек инициации трансляции [2–4]. У некоторых флавивирусов в вирионной РНК не обнаружено наличие *poly(A)*-последовательностей [5, 6], однако имеются и обратные данные, свидетельствующие о том, что РНК вируса КЭ сорбируется на *poly(U)*-целлюлозе [7].

Настоящая работа посвящена клонированию и определению первичной структуры ДНК-копий участков генома вируса КЭ. Непосредственное исследование структуры генома вируса КЭ осложняется патогенностью вируса и инфекционностью вирусной РНК. Применение методов генной инженерии позволяет обойти это затруднение.

Для конструирования рекомбинантных клонов, содержащих ДНК-копии участков генома вируса КЭ, использовали вирионную РНК. Вирус КЭ тип I, штамм *Sofin*, размножали на перевиваемой культуре клеток эмбрионов свиньи и концентрировали из культуральной жидкости осаждением полиэтиленгликолем (ПЭГ-6000). Вирионы очищали двукратным ультрацентрифугированием в градиенте плотности сахарозы. Из очищенных вирионов выделяли РНК фенольной экстракцией. Затем РНК очищали двукратным центрифугированием в сахарозном градиенте. В качестве матрицы использовали фракцию 40–45S РНК, обладающую максимальной инфекционностью.

Клонирование генома вируса КЭ проводили по методике работы [8]. На первом этапе с помощью РНК-зависимой ДНК-полимеразы на РНК вируса КЭ (5 мкг) синтезировали 0,21 мкг одноцепочечной комплементарной ДНК (оц-кДНК). Синтез проводили по модифицированному методу [9] в присутствии 4 мкг $(dT)_{13-18}$ -затравки и 50 мкг/мл ингибитора

* Запросы на оттиски посылать по данному адресу.

РНКазы А из плаценты человека [10]. РНК вируса КЭ разрушали кратковременной обработкой РНКазой А (10 мг/мл) в обычных условиях с последующим кипячением реакционной смеси в течение 3 мин. Полученную оц-кДНК превращали в двухцепочечную с помощью большого фрагмента ДНК-полимеразы I *E. coli* без добавления затравки в расчете на использование самокомплементарных шпилечных структур оц-кДНК. Шпилечные структуры на концах полученной двухцепочечной кДНК (дц-кДНК) расщепляли нуклеазой S1 и продукты подвергали гель-фильтрации на сефарозе 4В. В полимерной фракции было получено 25 нг дц-кДНК. К концам дц-кДНК присоединяли oligo(dC)-последовательности при помощи терминальной дезоксирибонуклеотидилтрансферазы из тимуса теленка по методу [8]; средний размер oligo(dC)-последовательностей составлял 15–20 н.з. В качестве вектора для клонирования использовали линейную форму ДНК плазмиды pBR322, полученную в результате ее гидролиза рестриктазой *Pst*I. На концы плазмидной ДНК наращивали сегменты oligo(dG) длиной 10–15 н.з. Подготовленную таким образом ДНК вектора (50 нг) отжигали с 10 нг дц-кДНК-(dC)_{15–20} в 100 мМ трис-

```

...GGGGGGGGGGGACCTCTCAGCGAGGCTCTTTGTGCGCTGCCGTA
GCTTCGTTCCCTCTGCTCACTGGTGGTCTAGGGACAAGGAAGATG
CAGTTAGTGGCTGAATGGAGTGGCTGTGTGGAGTGGCACCCAGAA
CTAATGAATGAACGTGGAGAGGTGAGCCTCGCCGTCGGCAGGAT
TCAATGGGGAACCTCCACCTGACAGAGCTTGAGAAAAGAGGAAAGA
GTGATGGCTTTTGGCTGCTGGCAGGACTGCCGCTTCAGCCTTC
CACTGGTCCGGCATCTTGGTGTGATGGGATTGTGGACGCTTTCA
GAAATGCTGAGAACGGCTCGAAGATCAGGCTTGGTCTTCTCTGGA
CAAGGAGGACCTGAGCGTGGTGCACAGGCCTTGTAGGTCAAGGAT
GGCGTGTACAGAATCTTCAGCCAGGACTGCTTTGGGGGACGCT
CAAGTGGGAGTTGGCTATGGTTCCAAAGGTGTCCTACACAGGATG
TGGCATGTGACGAGAGGGGGCGGCTTGTCCATTCATGACCCGCTC
GCAGCCCTATTGGGCTGATGTCAAAGAGGACGTTGTATGCTACG
CGCGACCTGGAGTCTTGAGGAGAAGTGGAAAGGTGAGACAGTGC
AGGTCCATGCCTTCCACCCGGGAGAGCTCATGAGGTGCATCAAT
TTCAGCCCGGAGAACTGCTCTGGACACAGGTACCCCCCCCCCCC...3'

```

Нуклеотидная последовательность ДНК-вставки рекомбинантной плазмиды № 131. Вставка эффективно гибридизуется с ³²P-меченой РНК вируса КЭ. Показана структура цепи, гомологичной последовательности нуклеотидов вирионной РНК

НСI-буфере, рН 8,0, содержащем 0,25 мМ EDTA. Смесь выдерживали 5 мин при 65°С, охлаждали до 44°С и инкубировали 3 ч. Полученными рекомбинантными молекулами трансформировали *E. coli* HB101 по методу [9]. Было получено 360 клонов с фенотипом Tc^rAr^s. Полученные колонии гибридизовали с фрагментированной ³²P-меченой РНК вируса КЭ, полученной в результате обработки РНК 1 М пиперидином в течение 15 мин при 25°С и последующего фосфорилирования продуктов гидролиза с помощью полинуклеотидкиназы и [γ -³²P]АТР. Путем гибридизации было отобрано 187 позитивных клонов. Из отобранных клонов были выделены ДНК рекомбинантных плазмид. Величину вставок в таких плаزمидах определяли электрофорезом в 1% агарозе. Для последующих исследований брали только клоны со вставками величиной от 300 до 2000 пар оснований (п.о.). Для установления взаимного расположения вставок к-ДНК из различных

плазмид относительно генома вируса КЭ использовали перекрестную гибридизацию *in situ* колоний ^{32}P -мечеными рестрикционными фрагментами вставок.

К настоящему времени определена область перекрывания клонирования дц-кДНК вируса, которая составляет около 3000 п.о. Методом Максама — Гилберта [11] были определены нуклеотидные последовательности некоторых ДНК-вставок, гибридизующихся с ^{32}P -меченой РНК вируса КЭ. На рисунке приведена нуклеотидная последовательность ДНК-вставки клона № 131. Эта последовательность переводится в аминокислотную только в одной рамке считывания и в одном направлении. Интересно, что на 3'-конце вставки имеется последовательность АСАСАGG, гомологичная обнаруженной вблизи 3'-концов у репликативной формы РНК вируса Западного Нила — одного из флавивирусов [6].

Расшифровка структуры генома вируса клещевого энцефалита и других флавивирусов представляет значительный интерес для понимания механизма взаимодействия этих вирусов с различными векторами и хозяевами и сродства к поражаемым ими весьма разнообразным тканям высших организмов, а также соответствующих механизмов иммунной защиты. Это семейство вирусов, кроме вируса КЭ, включает такие близко родственные вирусы, как вирус Киасанурской лесной болезни, омской геморрагической лихорадки, шотландского энцефаломиелита, вирусы Лангат, Нэгиши и более отдаленные практически важные объекты — вирусы желтой лихорадки, денге, японского энцефалита и др. Клонирование ДНК-копий генов вирионных белков и расшифровка их структуры может привести к созданию новых типов противовирусных вакцин, полученных методами генной инженерии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Portfield J. S., Casals J., Chumakov M. P., Gaidamovich S. Y., Hannoun C., Holmes I. H., Horzinek M. C., Mussgay M., Oker-Blom N., Trent D. W. *Intervirology*, 1978, v. 9, № 1, p. 129–148.
2. Westaway E. G. In: *The Togaviruses* / Ed. Schlesinger R. W. New York — London — Toronto — Sydney — San-Francisco: Acad. Press, 1980, p. 559–565.
3. Svitkin Y. V., Lyapustin V. N., Lashkevich V. A., Agol V. I. *Virology*, 1981, v. 110, № 1, p. 26–34.
4. Svitkin V. V., Ugarova T. Y., Chernovskaya T. V., Lyapustin V. N., Lashkevich V. A., Agol V. I. *Virology*, 1981, v. 110, № 1, p. 26–34.
5. Russell P. K., Brandt W. E., Dalrymple J. M. In: *The Togaviruses* / Ed. Schlesinger R. W. New York — London — Toronto — Sydney — San-Francisco: Acad. Press, 1980, p. 511–513.
6. Wengler G., Wengler G. *Virology*, 1981, v. 113, p. 544–555.
7. Лангсрун В. Н. Трансляция генома вируса клещевого энцефалита *in vitro* и *in vivo*. Автореф. дис.... канд. биол. наук. М.: Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов АМН СССР, 1980.
8. Liebscher D. H., Coutelle C., Rapoport T. A., Hahn V., Rosentahl S., Prehn S., Williamson R. *Gene*, 1980, v. 9, № 3/4, p. 233–246.
9. Hershfild V., Boyer H. V., Yanofsky C., Lovett M. A., Helinsky D. R. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1974, v. 71, № 9, p. 3455–3459.
10. Blackburn P. J. *Biol. Chem.*, 1979, v. 254, № 24, p. 12484–12487.
11. Maxam A. M., Gilbert W. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1977, v. 74, p. 560–564.

Поступило в редакцию
25.IX.1982

CLONING AND SEQUENCING OF DNA COPIES OF TICK-BORNE
ENCEPHALITIS VIRUS GENOME FRAGMENTS

CHUMAKOV M. P., KUSOV Yu. Yu., RUBIN S. G., SALNIKOV Ya. A.,
SEMASHKO I. V., GEORGIEV G. P., CHUMAKOV P. M., GRACHEV M. A.,
SHAMANIN V. A., PLETNEV A. G.

*Institute of Polyomyelitis and Viral Encephalites,
Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow;
Institute of Molecular Biology, Academy
of Sciences of the USSR, Moscow;
Novosibirsk Institute of Organic Chemistry,
Siberian Branch of the Academy of Sciences of the USSR, Novosibirsk*

RNA of a flavivirus — tick-borne encephalitis virus (Far-East, type 1, strain Sofin) was subjected to reverse transcription and the DNA copy was transformed into double-stranded DNA by action of *E. coli* DNA-polymerase (Klenow's fragment) without primer. The hairpin structures were removed by S1 nuclease. Oligo-dC-ends were attached to ds-cDNA thus obtained, and this DNA was annealed with pBR322 plasmid cut by PstI and equipped with oligo-dG termini. The recombinant plasmids were cloned in *E. coli* HB101. Of the 360 Tc^rAp^s clones obtained, 187 clones efficiently hybridized with partially degraded ³²P-RNA of TBE virus. The sequence of the insert of one of the clones was determined by the Maxam — Gilbert method. The 720 b.p. sequence is translatable into an amino acid sequence without interruption. Nearby the 3'-terminus of the insert, the sequence ACACAGG is present which is homologous with that found in RNA of the flavivirus West Nile.