



УДК 578.832.1А : 577.113.5

ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА СЕГМЕНТА 7 РНК ВИРУСА ГРИППА А/USSR/90/77(H1N1)

Самохвалов Е. И., Каргинов В. А. *, Чижиков В. Е. *,
Блинов В. М. *, Юферов В. П., Василенко С. К. *,
Урываев Л. В., Жданов В. М.

Институт вирусологии им. Д. И. Ивановского
Академии медицинских наук СССР, Москва;

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

Определена нуклеотидная последовательность сегмента 7 РНК вируса гриппа А/USSR/90/77 (H1N1) и дан анализ нуклеотидных замен в сравнении с известными первичными структурами сегмента 7 других штаммов вируса гриппа. Рассматриваются гипотетическая модель вторичной структуры сегмента 7 РНК вируса гриппа и прямой поворт как на нуклеотидном, так и на аминокислотном уровнях, обнаруженный в центре белка М₁.

Геном вируса гриппа типа А состоит из 8 одноцепочечных сегментов РНК отрицательной полярности [1], каждый из которых кодирует единственный вирусспецифический белок. Исключение составляет сегмент 8, который кодирует два неструктурных белка NS₁ и NS₂ [2], а также сегмент 7, кодирующий белки М₁ и М₂ (и, возможно, М₃), каждый из которых транслируется с собственной мРНК [3, 4]. Белок М₁ (матричный белок) является внутренним структурным компонентом вириона, играющим основную роль в морфогенезе вирусной частицы и, по-видимому, связанным с мембраной [5]. Кроме того, белок М₁ фосфорилирован и присутствует в вирионе в двух формах [6]. Функция белка М₂ пока не известна.

Полная нуклеотидная последовательность сегмента 7 определена для пяти штаммов вируса гриппа типа А [7-11]. Для других пяти штаммов определены 3'-концевые области (по 240 нуклеотидов) [12]. Имеющиеся данные позволяют предположить, что в целом белки М₁ и М₂ достаточно консервативны, однако анализ различных первичной структуры этих белков у разных штаммов может пролить свет на их функциональную роль. В настоящей работе сообщается о клонировании и секвенировании ДНК-копии сегмента 7 РНК вируса гриппа А/USSR/90/77.

Полученную ферментативным синтезом ДНК-копию сегмента 7 РНК вируса гриппа (см. «Экспериментальную часть») вводили по Pst I-сайту плазмиды pBR 322, используя гомополимерные концы poly(dC)·poly(dG)

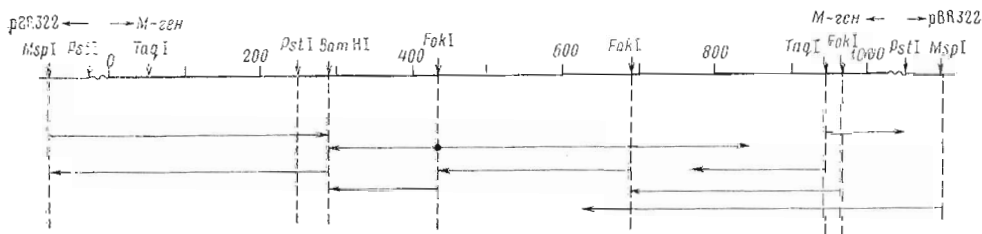


Рис. 1. Рестрикционная карта и стратегия секвенирования ДНК-копии сегмента 7 РНК вируса гриппа А/USSR/90/77. Стрелками указаны размеры секвенируемых участков и направление секвенирования. Введение 3'-концевой метки осуществляли с помощью ДНК-полимеразы I (фрагмент Кленова)

a

US B Ud PR	Met-Ser-Leu-Leu-Thr-Glu-Val-Glu-Thr-Tyr-Val-Leu-Ser-Ile-Val ----- Ile	15
	Pro-Ser-Gly-Pro-Leu-Lys-Ala-Glu-Ile-Ala-Gln-Arg-Leu-Glu-Asp	30
	Val-Phe-Ala-Gly-Lys-Asn-Thr-Asp-Leu-Glu-Ala-Leu-Met-Glu-Trp ----- Val	45
	Leu-Lys-Thr-Arg-Pro-Ile-Leu-Ser-Pro-Leu-Thr-Lys-Gly-Ile-Leu	60
	Gly-Phe-Val-Phe-Thr-Leu-Thr-Val-Pro-Ser-Glu-Arg-Gly-Leu-Gln	75
	Arg-Arg-Arg-Phe-Val-Gln-Asn-Ala-Leu-Asn-Gly-Asn-Gly-Asp-Pro	90
	Asn-Asn-Met-Asp-Arg-Ala-Val-Lys-Leu-Tyr-Arg-Lys-Leu-Lys-Arg ----- Lys	105
	Glu-Ile-Thr-Phe-His-Gly-Ala-Lys-Glu-Ile-Ala-Leu-Ser-Tyr-Ser ----- Ser	120
	Ala-Gly-Ala-Leu-Ala-Ser-Cys-Met-Gly-Leu-Ile-Tyr-Asn-Arg-Met	135
	Gly-Ala-Val-Thr-Thr-Glu-Ala-Ala-Phe-Gly-Leu-Ile-Cys-Ala-Thr Val Val Val Val Val Val Val Val	150
	Cys-Glu-Gln-Ile-Ala-Asp-Ser-Gln-His-Arg-Ser-His-Arg-Gln-Met Leu -----	165
	Val-Thr-Thr-Thr-Asn-Pro-Leu-Ile-Arg-His-Glu-Asn-Arg-Met-Val Ala Ala -----	180
	Leu-Ala-Ser-Thr-Thr-Ala-Lys-Ala-Met-Glu-Gln-Met-Ala-Gly-Ser	195
	Ser-Glu-Gln-Ala-Ala-Glu-Ala-Met-Glu-Val-Ala-Ser-Gln-Ala-Arg	210
	Gln-Met-Val-Gln-Ala-Met-Arg-Ala-Ile-Gly-Thr-His-Pro-Ser-Ser ----- Thr	225
	Ser-Ala-Gly-Leu-Lys-Asn-Asp-Leu-Leu-Glu-Asn-Leu-Gln-Ala-Tyr Asp Thr Asp -----	240
	Gln-Lys-Arg-Met-Gly-Val-Gln-Met-Gln-Arg-Phe-Lys	252

US	Met-Ser-Leu-Leu-Thr-Glu-Val-Glu-Thr-Pro-Ile-Arg-Asn-Glu-Trp	15
B		
Ud		
PR		
	Gly-Cys-Arg-Cys-Asn-Asp-Ser-Ser-Asp-Pro-Leu-Val-Val-Ala-Ala	30
	<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> — — Gly — — Thr — — Ile </div>	
	Ser-Ile-Ile-Gly-Ile-Leu-His-Leu-Ile-Leu-Trp-Ile-Leu-Asp-Arg	45
	<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> — — Asn — — Thr </div>	
	Leu-Phe-Phe-Lys-Cys-Ile-Tyr-Arg-Leu-Phe-Lys-His-Gly-Leu-Lys	60
	<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> — — Phe — — Glu — — Arg — — Tyr </div>	
	Arg-Gly-Pro-Ser-Thr-Glu-Gly-Val-Pro-Glu-Ser-Met-Arg-Glu-Glu	75
	<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> — — Gly — — Lys </div>	
	Tyr-Arg-Lys-Glu-Gln-Gln-Asn-Ala-Val-Asp-Ala-Asp-Asp-Ser-His	90
	<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> — — Ser — — Ser — — Gly </div>	
	Phe-Val-Asn-Ile-Glu-Leu-Glu	97
	<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> — — Ser — — Ser </div>	

Рис. 3. Аминокислотная последовательность белков M₁ (а) и M₂ (б) вируса гриппа А/USSR/90/77 (H1N1). Ниже показаны аминокислотные замены в белках M₁ и M₂ штаммов А/Bangkok/1/79, А/Udorn/72 и А/Puerto-Riko/8/34 (черта означает отсутствие замены в данном положении соответствующего белка)

и клонировали в *E. coli* MC 1061. Первичную структуру ДНК определяли методом Максама — Гилберта [13]. На рис. 1 приведена стратегия секвенирования клонированной ДНК-копии сегмента 7 РНК вируса гриппа А/USSR/90/77. Расшифрованная нуклеотидная последовательность гена белка М приведена на рис. 2, а первичные структуры M₁- и M₂-белков, кодируемые сегментом 7 РНК, представлены на рис. 3.

Сравнение расшифрованной нами нуклеотидной последовательности с известными из литературы [12] первичными структурами 3'-концевых областей РНК, кодирующих М-белки для штаммов А/PR/8/34, А/FW/1/50, А/Loyng/4/57, А/RI/5/57, А/Udorn/72, А/Canbera/77, А/Bangkok/1/79, показало, что наиболее близким к штамму А/USSR/90/77 является штамм А/FW/1/50 (таблица). Однако оценить меру «близости» указанных РНК можно только после определения полной первичной структуры сегмента 7 штамма А/FW/1/50.

Сравнение первичной структуры 3'-концевых участков сегмента 7 РНК различных штаммов вируса гриппа

Цифрами указаны положения сравниваемых нуклеотидов. Подчеркнуты нуклеотиды штаммов А/FW/1/50 и А/USSR/90/77, обладающие наибольшей гомологией по сравниваемым позициям

Штамм	4	18	31	37	55	58	68	70	94	100	124	127	130	136	143	147	196	205	214
А/PR/8/34	G	A	T	A	C	A	A	C	G	A	A	G	G	C	G	T	G	A	G
А/FW/1/50	G	A	T	A	C	T	G	C	G	A	T	G	G	C	G	C	G	A	G
А/Loyang/4/57	G	A	T	A	C	T	G	C	G	A	T	G	A	C	G	C	G	G	A
А/RI/5/57	G	A	T	A	C	T	G	C	G	G	T	G	G	C	C	G	C	G	A
А/Udorn/72	A	A	C	G	T	T	G	T	G	G	T	A	G	A	G	C	A	G	A
А/Canbera/77	G	A	C	A	T	T	G	T	A	G	T	G	G	C	C	C	G	G	A
А/USSR/90/77	A	G	T	A	C	T	G	C	G	A	T	G	G	C	G	C	G	A	G
А/Bangkok/1/79	A	A	C	A	T	T	G	T	A	G	T	A	G	A	G	C	G	G	G

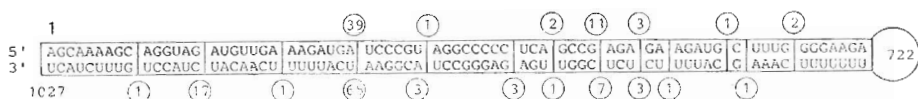


Рис. 4. Гипотетическая модель вторичной структуры сегмента 7 РНК вируса гриппа А/USSR/90/77. В петлях указано количество нуклеотидов

Сравнение полной нуклеотидной последовательности сегмента 7 штамма А/USSR/90/77 (Н1N1) с полными последовательностями для штаммов А/Bangkok/1/79 (Н3N2), А/Udorn/72 (Н3N2) и А/PR/8/34 (Н1N1) выявило соответственно 42,39 и 45 нуклеотидных различий. Из них «молчащие» замены, не приводящие к изменению аминокислот, составляют соответственно 34,31 и 25.

Ранее в литературе обсуждались данные, свидетельствующие о наличии определенной вторичной структуры РНК сегмента 5, кодирующего белок NP (нуклеопротеин) [14, 15]. На рис. 4 мы приводим гипотетическую модель вторичной структуры сегмента 7, полученную с помощью матрицы комплементарности [16]. Согласно этой модели, 5'- и 3'-концевые участки РНК сегмента 7 комплементарны на большей протяженности, чем это отмечалось ранее [17]. Рассчитанная по Типоко [18], энергия связывания для двухспирального участка, представленного на рис. 4, равна 89,9 ккал/моль. Роль вторичной структуры для сегментов РНК генома вируса гриппа изучена недостаточно, однако она может оказаться важной при морфогенезе вирусной частицы.

Другой отмеченной нами особенностью сегмента 7 РНК вируса гриппа является наличие в его структуре прямого повтора как на нуклеотидном, так и на аминокислотном уровнях (рис. 5). Наблюдается ярко выраженная гомология на участках 422—523 и 554—664 (нуклеотидные

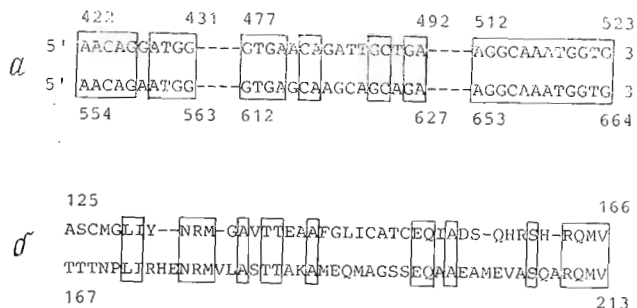


Рис. 5. Прямой повтор в нуклеотидной последовательности ДНК-копии сегмента 7 РНК вируса гриппа А/USSR/90/70 (*a*) и соответствующей ей аминокислотной последовательности (*b*). Цифры обозначают нуклеотидные (*a*) и аминокислотные (*b*) позиции. Обозначения аминокислот даны в однобуквенном коде. Участки полной гомологии взяты в рамку

позиции). Указанный повтор приходится на центр белка M₁, где локализуются наиболее консервативные аминокислоты. Наличие двух таких доменов в консервативной зоне матриксного белка дает возможность предположить, что помимо структурной функции мембраносвязанный белок M₁ несет еще другую, пока неизвестную функцию.

Экспериментальная часть

В работе использовали полинуклеотидкиназу и рестриктазы *Msp*I, *Pst*I, *Taq*I, *Bam*HI фирмы Boehringer (ФРГ).

Выращивание и очистку вируса гриппа А/USSR/90/77 (Н1N1), а также выделение вирионной РНК проводили как описано в работе [19]. Синтез первой цепи комплементарной ДНК (кДНК) на матрице тотальной

вирионной РНК вели в реакции обратной транскрипции с использованием синтетического 3'-концевого праймера d(AGCAAAAGCAGG). Суммарную кДНК фракционировали электрофорезом в 3% полиакриламидном геле с 7 М мочевиной. Фрагмент, соответствующий гену белка М (матриксного белка), элюировали из геля 2 М ацетатом аммония. Вторую цепь ДНК достраивали ДНК-полимеразой I (фрагмент Кленова) с использованием 5'-концевого синтетического праймера d(AGTAGAAACAAGG).

Синтез гомополимерных последовательностей poly(dC) на двукратной кДНК и poly(dG) на ДНК pBR322, обработанной рестриктазой *Pst*I, проводили как описано в работе [20]. После трансформации клеток *E. coli* MC 1061 по методу [21] колонии, содержащие гибридные плазмиды с вирусспецифической вставкой, выявляли гибридизацией с [³²P]кДНК, синтезированной на матрице суммарной вирионной РНК, по методу [22]. После рестрикционного анализа был отобран один клон, использованный при секвенировании.

Первичную структуру ДНК определяли методом Максама — Гилберта, вводя ³²P-метку в ДНК с помощью ДНК-полимеразы I (фрагмент Кленова) и [α -³²P]дезоксинуклеозидтрифосфатов по методу [13].

Авторы выражают благодарность С. Х. Дегтяреву (ВНИИ молекулярной биологии Главмикробиопрома СССР, Кольцово Новосибирской обл.) за любезно предоставленные препараты ферментов ДНК-полимеразы I (фрагмент Кленова) и *Fok*I, В. П. Кумареву (Институт биоорганической химии, Новосибирск) и В. Д. Смирнову (Институт вирусологии, Москва) за препараты синтетических праймеров.

ЛИТЕРАТУРА

1. Scholtissek C. *Curr. Topics Microbiol. Immunol.*, 1978, v. 80, p. 139–163.
2. Lamb R. A., Choppin P. W. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1979, v. 76, № 10, p. 4908–4912.
3. Inglis S. C., Brown C. M. *Nucl. Acids Res.*, 1981, v. 9, № 11, p. 2727–2740.
4. Inglis S. C., Brown C. M. *J. Gen. Virol.*, 1984, v. 65, № 1, p. 153–164.
5. Gregoriades A., Frangione B. J. *Virology*, 1981, v. 40, № 1, p. 323–328.
6. Gregoriades A., Christie T., Markarian K. J. *Virology*, 1984, v. 49, № 1, p. 229–235.
7. Allen H., McCauley J., Waterfield M., Gething M.-J. *Virology*, 1980, v. 107, № 2, p. 548–551.
8. Lamb R. A., Lay S.-J. *Virology*, 1981, v. 112, № 2, p. 746–751.
9. Ortin J., Martinez C., Riol L., Davila M., Lopez-Galinder C., Villanueva N., Domingo E. *Gene*, 1983, v. 23, № 2, p. 233–239.
10. McCauley J. W., Mahy B. W. J., Inglis S. C. *J. Gen. Virol.*, 1982, v. 50, № 1, p. 211–215.
11. Nakajima K., Nobusawa E., Nakajima S. *Virology*, 1984, v. 139, № 1, p. 194–198.
12. Hall R. M., Air G. M. *J. Virol.*, 1981, v. 38, № 1, p. 1–7.
13. Maxam A. M., Gilbert W. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1977, v. 74, № 2, p. 560–564.
14. Fields S., Winter G. *Gene*, 1981, v. 15, № 2, p. 207–214.
15. Беклемишев А. Б., Блинов В. М., Василенко С. К., Головин С. Я., Гутаров В. В., Каргинов В. А., Мамаев Л. В., Микрюков Н. Н., Нечесов С. В., Петренко В. А., Петров Н. А., Сандазчиев Л. С. *Биоорг. химия*, 1984, т. 10, № 11, с. 1535–1543.
16. Lejeune R., Deneuborg J. L. *Adv. Chem. Phys.*, 1975, v. 29, p. 349–374.
17. Desselberger U., Rucaniello V. R., Zazza J. J., Palese P. *Gene*, 1980, v. 8, № 3, p. 315–328.
18. Comay E., Nassinov R., Comay O. *Nucl. Acids Res.*, 1984, v. 12, № 1, p. 53–60.
19. Nave C. W., Webster R. G. *Virology*, 1983, v. 129, № 2, p. 298–308.
20. Roychoudhury R., Jay E., Wu R. *Nucl. Acids Res.*, 1976, v. 3, № 1, p. 101–106.
21. Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J. In: *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratories, USA, 1982, p. 250–251.
22. Grunstein M., Hogness D. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1975, v. 72, № 10, p. 3961–3965.

Поступила в редакцию
25.11.1985

PRIMARY STRUCTURE OF RNA SEGMENT 7 OF THE INFLUENZA
VIRUS A/USSR/90/77(H1N1)

SAMOKHVALOV E. I., KARGINOV V. A. *, CHIZHIKOV V. E. *, BLINOV V. M. *,
YUFEROV V. P., VASILENKO S. K. *, URYVAEV L. V., ZHDANOV V. M.

D. I. Ivanovsky Institute of Virology, Academy of Medical Sciences, Moscow;
**All-Union Research Institute of Molecular Biology, Kol'tsovo,*
Novosibirsk Region

The double-stranded DNA copy of the matrix protein (M) gene of the influenza virus A/USSR/90/77(H1N1) has been inserted in *Pst*I site of plasmid pBR322 and cloned in *E. coli*. The full-length DNA copy of the M gene has been sequenced using Maxam – Gilbert method. Analysis of nucleotide sequence of segment 7 RNA of influenza virus A/USSR/90/77 and nucleotide substitutions, as compared with known primary structures of segment 7 RNA for other strains, is presented. A hypothetical model of secondary structure of segment 7 RNA of influenza virus and repeating sequences at nucleotide and amino acid levels, revealed in the central region of M₁ protein, are discussed.