



УДК 578.832.1:578.5

ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА ПОЛНОРАЗМЕРНОЙ ДНК-КОПИИ
ГЕНА БЕЛКА PB1 ВИРУСА ГРИППА

А/КИЕВ/59/79

(H1N1)

*Петров Н. А., Головин С. Я., Мамаев Л. В.,
Нетесов С. В., Василенко С. К.**Всесоюзный научно-исследовательский институт молекулярной биологии,
пос. Кольцово Новосибирской обл.*

Определена полная первичная структура гена PB1 вируса гриппа А/Киев/59/79 (H1N1), завершающая полную структуру генома его реассортанта со штаммом А/PR/8/34. Показано родство гена белка PB1 вируса А/Киев/59/79 с соответствующими генами вирусов подтипа H3N2.

Настоящая работа завершает цикл исследований реассортантного генома вируса А/Киев/59/79/R антигенного подтипа H1N1 [1–5]. Она посвящена получению, клонированию и определению первичной структуры полноразмерной ДНК-копии РНК-сегмента 2, кодирующего белок PB1. Этот белок участвует как в транскрипции вирусных мРНК, так и в синтезе полных цепей (репликации), осуществляя процесс элонгации [6–9].

Расшифрованная последовательность нуклеотидов гена приведена на рисунке в форме позитивной цепи кДНК вместе с соответствующей ей аминокислотной последовательностью белка PB1. Более 80% первичной структуры ДНК-копии было прочитано по обсем цепям и 30% определено в еще одном независимом клоне кДНК.

При сравнении с аналогичными генами других штаммов (см. рисунок) выяснилось, что установленная нами последовательность наиболее близка к гену вируса А/NT/60/68 и значительно отличается от остальных опубликованных структур [10–12]. В этом отношении ген PB1 сходен с ранее изученными нами генами NP и PB2 вируса Киев/79. Для всех них характерна более высокая степень гомологии с генами вирусов антигенного подтипа H3N2, чем с H1N1, несмотря на то что исследуемый вирус относится именно к последнему подтипу. В этой связи необходимо отметить, что функции белков упомянутых трех генов, а также гена PA тесно взаимосвязаны и осуществляются в результате объединения их в единый полимеразный комплекс [6–9]. Все это свидетельствует в пользу высказанного нами ранее предположения о том, что вирус А/Киев/59/79 представляет собой естественный реассортант по генам полимеразного комплекса с современными ему вирусами подтипа H3N2 [2]. Что же касается происхождения остальных генов в изучаемом вакцинном реассортанте, то на основе анализа полной первичной структуры его генома выяснено, что от лабораторного штамма А/PR/8/34 им унаследованы только гены белков PA, M и NS. Гены HA, NA, PB1, PB2 и NP происходят от эпидемического изолята подтипа H1N1 [1–5], который в свою очередь представляет собой естественный реассортант, унаследовавший от вирусов подтипа H3N2 гены белков PB1, PB2, NP и, вероятно, PA. Дальнейшие исследования исходного эпидемического вируса А/Киев/59/79 позволяют подтвердить природную реассортантность его генома и расшифровать первичную структуру генов, не вошедших в состав лабораторного вакцинного штамма.

M D V N P T L L F L K V

1 AGCAAAAGCAGGCAAAACCATTTGAATGGATGTCAATCCGACTCTACTTTTCTTAAAAGTT 60
 2
 3 G T G
 4 G T G

P A Q N A I S T T F P Y T G D P P Y S H

1 CCAGCGCAAAATGCCATAAGCACCACATTCGCTTATACTGGAGATCCTGCATACAGGCAT 120
 2
 3 A T A T C C T
 4 A T A T C T

G T G T G Y T M D T V N R T H Q Y S E K

1 GGAACAGGAACAGGATACACCATGGACACAGTCAACAGAACACATCAATATTCAGAAAAA 180
 2
 3 G T T G G C G
 4 G T T G G C GG

G K W T T N T E T G A P Q L N P I D G P

1 GGGAAAGTGGACAACAAACACAGAGACTGGGGCGCCCCAACTTAACCCGATTGATGGACCA 240
 2 G A A A
 3 A GA C A A A G C G
 4 A GA C A A A G C G

L P E D N E P S G Y A Q T D C V L E A M

1 CTACCTGAGGATAATGAGCCAAGTGGATATGCACAAACAGACTGTGTCTTGAAGCTATG 300
 2 A
 3 G A A C A T C T AT A
 4 G A A C A T C T AT A

A F L E E S H P G I F E N S C L E T M E

1 GCTTTCCTTGAGGAATCCCACCCAGGGATCTTTGAAAACCTCGTGTCTTGAACAATGGAA 360
 2 A G
 3 T T T T A G G
 4 C T T T G C G G

V V Q Q T R V D R L T Q G R Q T Y D W T

1 GTTGTTC AACAAACAAGGGTGGACAGACTGACACAAGGTGTCAGACCTATGATTGGACA 420
 2 C
 3 G C A A AG C A C T
 4 G C A AG C A C T

L N R N Q P A A T A L A N T I E V F R S

1 STAAACAGAAATCAACCCGGCCGCAACTGCATTAGCCAACACTATAGAAGTTTTCAGATCG 480
 2 T C
 3 T T C G T T A G A G A
 4 T G C G T T A G A G A

N G L T A N E S G R L I D F L K D V M E

1 AATGGTCTAACAGCTAATGAGTCGGGAAGGCTAATAGATTTCCCTCAAGGATGTGATGGAA 540
 2 A
 3 C C G C T C C T A G
 4 C C G C A C C C T A G

S M D K E E I E I T T H F Q R K R R V R

1 TCAATGGATAAAGAGGAAATAGAGATAACAACACACTTCCAAAGAAAAGAAGAGTAAGA 600
 2 G
 3 A A A G G C T T T G G C G G
 4 A C A G C C T T T G G C G

Экспериментальная часть

Для получения ДНК-копий генов вируса гриппа А/Киев/59/79 был использован его высокоурожайный реассортант со штаммом А/PR/8/34, полученный во ВНИИ гриппа МЗ СССР (Ленинград) и применявшийся в течение ряда лет для массовой вакцинации в форме инактивированной вакцины. Подробные методики клонирования и определения первичной структуры химическим методом с учетом последующих модификаций [13-18] приведены в наших предыдущих работах [4, 19]. Отбор клонов, содержащих копии гена РВ1, производили по результатам гибридизации отпечатков колоний с радиоактивно меченым синтетическим олигонуклеотидным зондом, комплементарным участку 699-713 с 3'-конца негативной цепи гена РВ1 штамма А/NT/60/68. В результате были отобраны два клона, один из которых содержал копию участка 1-863 нуклеотидов с 3'-конца РНК, а второй — полноразмерную копию гена.

1 D N M T K K M V T Q R T I G K K K Q R V 660
 2 GACAACATGACCAAGAAAATGGTCACACAAAAGAACAATAGGAAAAGAAAAGCAGAGAGTG
 3 T T A A G T A G G A T
 4 T T G G T A G G T

1 N K R S Y L I R A L T L N T M T K D A E 720
 2 AACAAAGAGAAGCTATCTAATAAGAGCATTAAACATTGAACACAATGACCAAAGATGCAGAA
 3 A G T T G C C T G
 4 A G T T G G C C T G

1 R G K L K R R A I A T P G M Q I R G F V 780
 2 AGAGGTAAATTAAGAGAAGGGCTATTGCAACACCCGGGATGCAAATCAGAGGGTTCGGTG
 3 G GC AC G A A C A A G T A
 4 G GC AC G A A C A A G T A

1 Y F V E T L A R S I C E K L E Q S G L P 840
 2 TACTTTGTTGAAACTCTAGCTAGGAGCATTGTGTGAGAAGCTGAACAGTCTGGACTTCCA
 3 G A G A T A A A A GT G
 4 G A A T A A A T G

1 V G G N E K K A K L A N V V R K M M T N 900
 2 GTTGAGGTAATGAAAAAGGCCAAACTGGCAAATGTTGTGAGGAAGATGATGACTAAT
 3 C G A A GT A C
 4 C G A A GT A C

1 S Q D T E L S F T I T G D N T K W N E N 960
 2 TCACAAGACACAGAGCTTCTTTTCACAATTACTGGAGACAATACTAAGTGGAAATGAAAAAT
 3 T G C A G C C T C C A C
 4 T G T AA C C T C C A C

1 Q N P R M F L A M I T Y I T K N Q P E W 1020
 2 CAAAATCCTCGAATGTTCCCTGGCGATGATTACATATATCACAAAAAATCAACCTGAATGG
 3 G G TT C C G C G G C C
 4 G C G TT C C A C G G C C

1 F R N I L S I A P I M F S N K M A R L G 1080
 2 TTCAGAAAACATCCTGAGCATCGCACCCATAATGTTCTCAAACAATAATGGCGAGACTAGGG
 3 G T T G T A T T T A G A
 4 T G T A T T T A G A

1 K G Y M F E S K R M K L R T Q I P A E M 1140
 2 AAAGGATACATGTTTCGAAAAGTAAGAGAATGAAGCTCCGAACACAAAATACCAGCAGAAATG
 3 G T T G C T A TA T T
 4 G G T G C T AA TA T T

1 L A S I D L K Y F N E S T R K K I E K I 1200
 2 CTAGCAAGCATTGACCTAAAGTATTTCAATGAATCAACAAGAAAAGAAAATGAGAAAATA
 3 TT G A T G A C
 4 C TT G A C T T G A C

R P L L I D G T A S L S P G M M M G M F
 1 AGGCCTCTTCTAATAGATGGCACAGCGTCATTGAGCCCTGGAATGATGATGGGCATGTTC 1260
 2 T T
 3 C A G CT G G T A
 4 C G CT G T A

N M L S T V L G V S I L N L G Q K K Y T
 1 AACATGCTAAGCACGGTTTTAGGAGTCTCAATACTGAACTCTGGACAAAAGAAATACACC1320
 2 T C G G
 3 T T T A C C C G
 4 T T T A C C C G C

K T T Y W W D G G L Q S S D D F A L I V N
 1 AAAACAACCTTACTGGTGGGATGGGCTCCAATCCTCTGATGATTTTGCCTCATAGTGAAT 1380
 2 A A
 3 G T T T C G T
 4 G T T T T G T

A P N H E G I Q A G V D R F Y R T C K L
 1 GCACCAAATCATGAGGGAATACAAGCAGGAGTGGATAGATTCTACAGAACCTGCAAGTTA 1440
 2
 3 C A G T C C C G T TC T C
 4 C A G T C C A C G T TC T C

V G I N M S K K K S Y I N R T G T F E F
 1 GTCGGAATCAACATGAGCAAGAAGAAGTCCTATATAAAATAGGACAGGAACGTTTGAATTC 1500
 2 T A A
 3 C T T A T C C A T A
 4 C T T A T C C A T A

T S F F Y R Y G F V A N F S M E L P S F
 1 ACAAGCTTTTTTATCGCTATGGATTTGTGGCCAATTTAGCATGGAGCTGCCAGTTTT 1560
 2 C A
 3 T C T G T C T
 4 T C T G T C T C

G V S G I N E S A D M S I G V T V I K N
 1 GGAGTGTCTGGGATTAATGAATCAGCTGATATGAGCATTGGAGTAACAGTGATAAAGAAC 1620
 2 G
 3 G C C G C T T T C C A
 4 G C C G T G C T T T C C A

N M I N N D L G P A T A Q M A L Q L F I
 1 AACATGATAAACAATGACCTTGGACCAGCAACAGCCCAGATGGCTCTTCAACTGTTTCATC 1680
 2
 3 T T T T A C GT
 4 T T T C T A C G

K D Y R Y T Y R C H R G D T Q I Q T R R
 1 AAGGACTACAGATATACATATCGGTGCCACAGAGGAGACACAAAATTCAGACGAGGAGA 1740
 2 C
 3 A T G C G C A T T A A C C A
 4 A T G C G C T T A A C C A

S F E L K K L W E Q T R S K A G L L V S
 1 TCATTGAGCTAAAGAAGCTGTGGGAGCAAACCCGATCAAAGGCAGGACTATTGGTTTCA 1800
 2 G C
 3 T AA A T C A T GC C C
 4 T AA A AT C A T GC C C

D G G P N L Y N I R N L H I P E V C L K
 1 GATGGAGGACCAAACCTTATACAATATCCGGAATCTTCACATCCCTGAAGTCTGCTTAAAG 1860
 2 G
 3 C C T C T A A C T G A
 4 C C T C T A A C T G A

W E L M D E D Y Q G R L C N P L N P F V
 1 TGGGAGTTAATGGATGAGGACTATCAGGGAAGACTTTGTAATCCCCTGAATCCATTGTG 1920
 2 G A
 3 A G T C GC T T A C C A C
 4 A T C GC T T A C C A C

S H K E I E S V N N A V V M P A H G P A
 1 AGCCATAAAGAGATTTGAGTCTGTAAACAATGTGTGGTAATGCCAGCTCATGCTCCAGCC 1980
 2 G
 3 A A A A G A A G A
 4 A C A A G A A A

K S M E Y D A V A T T H S W I P K R N R
 1 AAGAGCATGGAATATGACGCTGTGCAACTACACACTCCTGGATTCCCAAGGGAACCGG 2040
 2 T
 3 A A G T A C A A T A
 4 A A G T A C A A T A

S I L N T S Q R G I L E D E Q M Y Q K C
 1 TCTATTCTCAACACAAGCCAAAGGGGAATCTTGAGGATGAACAGATGTATCAGAAGTCC 2100
 2 C A
 3 C CT G T T A G A A A C A G
 4 C CT G T A A A A C A

C N L F E K F F P S S S Y R R P V G I S
 1 TGCAACCTGTTCGAGAAATTTTCCCCAGTAGTTCATACAGGAGACCCGGTGGAAATTTCC 2160
 2
 3 T T A T A C C A A C G A
 4 T A T A C C A A C G A

S M V E A M V S R A R I D A R I D F E S
 1 AGCATGGTGGAGGCCATGGTGTCTAGGGCCCGGATTGATGCCAGAAATGACTTCCGACTCT 2220
 2
 3 T T T C A A A C G T A
 4 T T T C A A A C T A

G R I K K E E F S E I M K I C S T I E E
 1 GGACGAATTAAGAAAGAAGAGTCTCCGAGATCATGAAGATCTGTTCCACCATTGAAGAG 2280
 2 G G
 3 A G A A T
 4 A G A C A T

L R R Q K
 1 CTCAGACGGCAAAAATAATGAATTTAGCTTGTCTCCTTCATGAAAAAATGCCTTGTCTTCTACT 234
 2 G
 3 G
 4 G

Последовательность нуклеотидов ДНК-копии сегмента 2 генома вируса гриппа А/Киев/59/79 в форме позитивной цепи (строка 1) и соответствующая ей ампликислотная последовательность белка РВ1. В строках 2-4 приведены только различающиеся нуклеотидные остатки в генах РВ1 следующих штаммов: 2 - А/NT/60/68 [10], 3 - А/PR/8/34 [11], 4 - А/WSN/33 [12]

Авторы выражают благодарность С. Х. Дегтяреву, Н. А. Негесовой, И. Д. Петровой за предоставленные препараты ферментов, Г. Ф. Сиволобовой за синтез зонда, а также А. Е. Никулину и А. П. Донченко за помощь в компьютерной обработке результатов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Беклемишев А. Б., Блинов В. М., Василенко С. К., Головин С. Я., Каргинов В. А., Мамаев Л. В., Негесов С. В., Петров Н. А., Сафронов П. Ф. // Биоргани. химия. 1985. Т. 11. № 10. С. 1423-1426.
2. Беклемишев А. Б., Блинов В. М., Василенко С. К., Головин С. Я., Каргинов В. А., Мамаев Л. В., Негесов С. В., Петров Н. А., Сафронов П. Ф. // Биоргани. химия. 1986. Т. 12. № 3. С. 369-374.

13. 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. // Биооргани. химия. 1986. Т. 12. № 3. С. 375-381.
14. Петрова Н. А., Нетесов С. В., Головин С. Я., Мамаева Н. В., Мамаев Л. В., Сиволобова Г. Ф., Петренко В. А., Василенко С. К. // Биооргани. химия. 1987. Т. 13. № 7. С. 915-920.
15. Беклемишев А. Б., Блинов В. М., Василенко С. К., Головин С. Я., Каргинов В. А., Мамаев Л. В., Микрюков Н. Н., Нетесов С. В., Петренко В. А., Петров Н. А., Фролов И. В. // Биооргани. химия. 1985. Т. 11. № 5. С. 641-645.
16. Romanos M. A., Nau A. J. // Virology. 1984. V. 132. № 1. P. 110-117.
17. Ulmanen J., Broni B. A., Krug R. M. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1981. V. 78. № 12. P. 7355-7359.
18. Horrisberger M. // Virology. 1982. V. 120. № 2. P. 279-286.
19. Braam J., Ulmanen J., Krug R. M. // Cell. 1983. V. 34. № 2. P. 609-618.
20. Bishop D., Huddleston J. A., Brownlee G. G. // Nucl. Acids Res. 1982. V. 11. № 4. P. 1335-1343.
21. Winter G., Fields S. // Nucl. Acids Res. 1982. V. 10. № 6. P. 2135-2143.
22. Sivasubramanian N., Nayak D. P. // J. Virol. 1982. V. 44. № 1. P. 321-329.
23. Maxam A. M., Gilbert W. G. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1977. V. 74. № 2. P. 560-564.
24. Smith D. R., Calvo J. M. // Nucl. Acids Res. 1980. V. 8. № 10. P. 2255-2274.
25. Ansorge W., Mayer L. // J. Chromatogr. 1980. V. 202. № 1. P. 45-53.
26. Garoff H., Ansorge W. // Anal. Biochem. 1981. V. 115. № 2. P. 450-457.
27. Ansorge W., Barker R. // J. Biochem. and Biophys. Meth. 1984. V. 9. № 1. P. 33-47.
28. Коробко В. Г., Грачев С. А., Колосов М. Н. // Биооргани. химия. 1978. V. 4. № 9. С. 1281-1283.
29. Беклемишев А. Б., Блинов В. М., Василенко С. К., Головин С. Я., Гуторов В. В., Каргинов В. А., Мамаев Л. В., Микрюков Н. Н., Нетесов С. В., Петренко В. А., Петров Н. А., Сандахчиев Л. С. // Биооргани. химия. 1984. Т. 10. № 11. С. 1535-1543.

Поступила в редакцию
5.I.1987

NUCLEOTIDE SEQUENCE OF A FULL-LENGTH DNA-COPY OF THE INFLUENZA VIRUS A/KIEV/59/79(H1N1) PB1 GENE

PETROV N. A., GOLOVIN S. YA., MAMAIEV L. V., NETESOV S. V.,
VASILENKO S. K.

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

Nucleotide sequence of the A/Kiev/59/79 influenza virus PB1 gene is reported, thus completing the full-genome primary structure of the recombinant between the virus and laboratory strain A/PR/8/34. The parental strain A/Kiev/59/79(H1N1) is, in turn, shown to be a natural reassortant inheriting its genes of polymerase complex (PB1, PB2, NP and, in all probability, PA) from contemporary H3N2 influenza virus strains.