



ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 577.112 : 577.242.3 : 579.252

КЛОНИРОВАНИЕ ФРАГМЕНТОВ ДНК
С ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЯМИ ГЕНА БАКТЕРИООПСИНА
ИЗ РАЗНЫХ ШТАММОВ *HALOBACTERIUM HALOBIIUM*

Зозуля С. А., Зайцева Е. М., Свердлов Е. Д.

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва

Бактериородопсин, мембранный белок *Halobacterium halobium*, являющийся светозависимым протонным насосом, в последние годы стал объектом интенсивного исследования. Для изучения функций этого белка представляется важным осуществить его экспрессию в *E. coli*. Ранее уже сообщалось о клонировании гена бактериоопсина в *E. coli* и определении его нуклеотидной последовательности [1].

В данной работе проведено клонирование фрагментов ДНК *H. halobium*, содержащих последовательности гена бактериоопсина из трех различных штаммов галобактерий. Ген опсина в одном из них, штамме R1, находится в одинаковом генетическом окружении с описанным в работе [1]. В штамме S1 в передней части гена опсина обнаружена вставка длиной ~1,7 тыс. п.о. В мутантном по синтезу опсина штамме R1mR обнаружена вставка длиной ~0,5 тыс. п.о., находящаяся в середине структурной части гена опсина и, очевидно, ответственная за его инактивацию. Методом блот-гибридизации показано, что в двух других штаммах, диком и R1M1, окружение гена опсина не отличается от такового в штамме R1.

В качестве метода идентификации фрагментов, содержащих ген опсина, мы использовали гибридизацию с синтетическими олигонуклеотидами рестриктированной суммарной ДНК *H. halobium*. После клонирования соответствующих фрагментов в *E. coli* эти олигонуклеотиды были использованы в качестве зондов для идентификации требуемых клонов. С этой целью были химически синтезированы два дезоксиолигонуклеотида, комплементарных различным участкам гена, — тридекануклеотид состава d(TTACACACATATC) и гексадекануклеотид d(GTTGTTGTTAGACCTC). Препараты суммарной ДНК каждого из пяти исследуемых штаммов после исчерпывающего гидролиза одной из нескольких рестрикционных эндонуклеаз (*Pst*I, *Eco*RI, *Xma*I, *Bam*HI, *Bcn*I) и электрофореза в агарозном геле переносили на нитроцеллюлозные фильтры и гибридовали с [³²P]-мечеными олигонуклеотидными зондами [2]. Электрофоретические подвижности гибридирующихся фрагментов были одинаковы во всех случаях у штаммов R1, R1M1 и дикого, но у штаммов R1mR и S1 отличались от первых трех и друг от друга.

Для выделения и клонирования фрагментов, содержащих ген бактериоопсина, использовали ДНК штаммов R1, R1mR и S1, расщепленную рестриктазой *Pst*I. Основываясь на данных гибридизации, после фореа фрагментированной ДНК в агарозных гелях сумму фрагментов нужной длины элюировали и встраивали в плазмиду pBR322 по сайту рестриктазы *Pst*I. После трансформации штамма *E. coli* HB101 и отбора целевых рекомбинантов методом гибридизации с колониями [3] были получены клоны, содер-

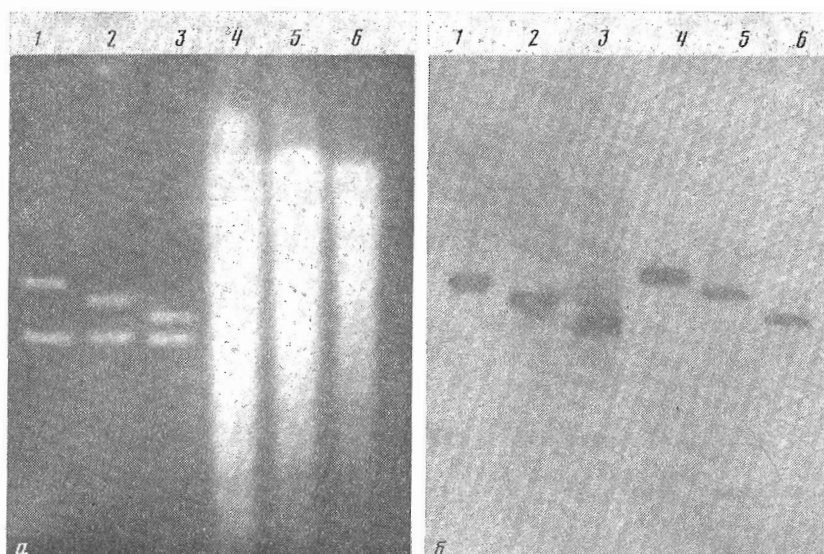


Рис. 1. а — электрофорез в 0,8% агарозном геле расщепленных эндонуклеазой рестрикции *Pst*I плазмид pZK1S1 (1), pZK1R1mR (2), pZK1R1 (3), ДНК штамма S1 (4), штамма R1mR (5), штамма R1 (6); б — радиоавтограф после гибридизации перенесенной из геля на нитроцеллюлозу ДНК с [³²P]-меченым гексануклеотидом. Расположение колонок то же

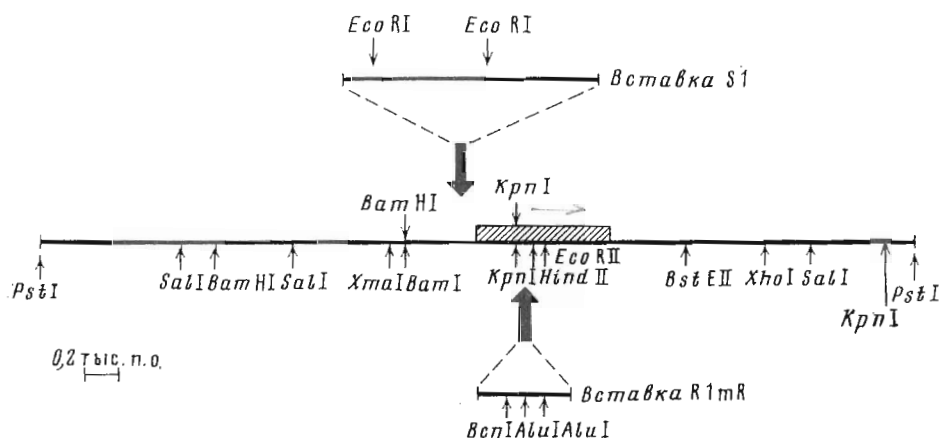


Рис. 2. Физическая карта *Pst*I-фрагмента штамма R1 *H. halobium*, содержащего ген бактериоопсина. Указана локализация вставок для штаммов S1 и R1mR. Кодированная последовательность гена бактериоопсина отмечена штриховкой. Для *Eco*RII, *Hind*II, *Bcn*I, *Alu*I указаны не все сайты рестрикции на фрагменте

жащие плазмиды pZK1R1, pZK1S1 и pZK1R1mR. Эти плазмиды содержали клонированные в *Pst*-I сайт pBR322 фрагменты ДНК штаммов R1 (длиной 5,0 тыс. п.о.), S1 (6,7 тыс. п.о.) и R1mR (5,5 тыс. п.о.) соответственно (рис. 1). Путем рестрикционного анализа были получены физические карты всех трех фрагментов.

Расположение участков рестрикции и гибридизации с зондами указывает на присутствие в этих фрагментах последовательностей гена бактериоопсина. Различный размер *Pst*-I фрагментов объясняется наличием вставок в области бактериоопсинового гена. Вставка во фрагменте, полученная из штамма R1mR (безродопсиновый мутант), имеет длину ~0,5 тыс. п.о. и локализована внутри фрагмента *Kpn*I-*Hind*II (0,1 тыс. п.о.), находящегося в центральной части кодирующей последовательности гена (рис. 2). Вставка во фрагменте из штамма S1 имеет длину ~1,7 тыс. п.о. и локализована внутри фрагмента *Vam*HI — *Kpn*I (0,6 тыс. п.о.) (рис. 2).

В последнее время появились данные о том, что геном *Halobacterium* содержит мобильные элементы, перемещающиеся внутри него с высокой

частотой [4]. Была установлена полная первичная структура одного из них, представляющего собой аналог IS элементов и инактивирующего при встраивании ген бактериоопсина [5], а также показано существование подобных вставок для нескольких других безродопсиновых мутантов [6]. Обнаруженные нами вставки по размерам и расположению сайтов рестрикции отличаются от описанных в литературе и, возможно, представляют собой новые варианты IS элементов *H. halobium*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Dunn R., McCoy J., Simsek M., Majumdar A., Chang S. H., RajBhandary U. L., Khorana H. G. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1981, v. 78, № 11, p. 6744-6748.
2. Southern E. M. J. Mol. Biol., 1975, v. 98, № 3, p. 503-517.
3. Hanahan D., Meselson M. Gene, 1980, v. 10, № 1, p. 63-67.
4. Sapienza C., Doolittle W. F. Nature, 1982, v. 295, № 5848, p. 384-389.
5. Simsek M., DasSarma S., RajBhandary U. L., Khorana H. G. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1982, v. 79, № 23, p. 7268-7272.
6. Betlach M., Pfeifer F., Friedman J., Boyer H. W. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1983, v. 80, № 5, p. 1416-1420.

Поступило в редакцию
29.VII.1983

CLONING OF THE DNA FRAGMENTS CONTAINING BACTERIOOPSIN GENE SEQUENCES FROM SEVERAL STRAINS OF *HALOBACTERIUM HALOBIUM*

ZOZULYA S. A., ZAITSEVA E. M., SVERDLOV E. D.

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

The DNA fragments of *H. halobium* strains R1, S1 and R1mR containing bacterioopsin gene sequences were isolated and cloned into *Pst*I site of pBR 322 plasmid using two synthetic oligonucleotides as hybridization probes. Mutant strains S1 and R1mR appeared to have DNA IS element-like inserts of about 1.7 kbp and 0.5 kbp long respectively in the bacterioopsin gene region.