



ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 575.15:577.113.5

НОВЫЙ *IS*-ЭЛЕМЕНТ *HALOBACTERIUM HALOBIVUM*
ЛОКАЛИЗОВАН В ГЕНЕ БАКТЕРИООПСИНАОвчинников Ю. А., Зозуля С. А., Зайцева Е. М.,
Гурьев С. О., Свердлов Е. Д., Крупенико М. А.,*
Александров А. А.**

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

* ВНИИ генетики и селекции промышленных микроорганизмов, Москва;

** Институт молекулярной генетики Академии наук СССР, Москва

Экстремально галофильные бактерии вида *H. halobium* принадлежат к первичному царству архебактерий [1] и обладают рядом своеобразных качеств, среди которых следует особо отметить способность к синтезу мембранного фоторецепторного белка бактериородопсина [2] и высокую частоту мутаций, вызываемых подвижными генетическими элементами, подобными хорошо охарактеризованным *IS*-элементам *E. coli* [3, 4]. В процессе изучения генов, кодирующих синтез бактериоопсина в *H. halobium* дикого типа и гомологичных генов в мутантных по синтезу данного белка штаммах, мы клонировали в *E. coli* гены из штаммов *H. halobium S1* и *R1mR*, содержащие вставки длиной ~1,7 и 0,5 т.п.о. соответственно внутри кодирующей последовательности [5]. В данной работе приводятся результаты определения нуклеотидной последовательности концевых участков этих вставок, обладающих характерными чертами бактериальных *IS*-элементов.

Последовательности, гомологичные гену бактериоопсина, были встроены в плазмиду pBR322 в составе *Pst*I-фрагментов ДНК из штаммов *S1* (6,7 т.п.о.) и *R1mR* (5,5 т.п.о.) с образованием рекомбинантных плазмид pZK1S1 и pZK1R1mR соответственно. Расположение вставок в обоих случаях было определено с помощью рестриктоного анализа этих *Pst*I-фрагментов (рис. 1) и в случае *S1* подтверждено электронной микроскопией гетеродуплексов между плазмидами pZK1R1 (штамм *R1* — источник гена дикого типа) и pZK1S1, расщепленными рестрикционной эндонуклеазой *Pvu*II, имеющей единственный участок узнавания в этих плазмидах (рис. 2). Для определения последовательностей вставок содержащие их фрагменты выделяли из плазмид после расщепления эндонуклеазами рестрикции *Kpn*I, *Hind*II (для pZK1R1mR) или *Kpn*I, *Bam*HI (для pZK1S1). Нуклеотидные последовательности нужных субфрагментов определяли методом Максама — Гилберта [6].

На рис. 3 приведены последовательности концевых участков вставок *ISH S1* (штамм *S1*) и *ISH 2* (штамм *R1mR*), а также прилегающих к ним участков гена бактериоопсина. Обе вставки обладают структурными особенностями, характерными для бактериальных *IS*-элементов [4]: наличием целевой последовательности в бактериальной ДНК (8-нуклеотидной для *ISH S1* и 20-нуклеотидной для *ISH 2*), дублирующей по сторонам элемента при его встраивании, и обращенных повторяющихся последовательностей с флангов элемента (прерванной 26-нуклеотидной для *ISH S1* и совершенной 19-нуклеотидной для *ISH 2*). В последнее время опубликована полная нуклеотидная последовательность трех *IS*-элементов из *H. halobium*: *ISH 1* [7], *ISH 2* [3], *ISH 50* [8]. Данные по рестриктному анализу и определению 45% нуклеотидной последовательности вставки из штамма *R1mR H. halobium* позволяют заключить, что она идентична элементу *ISH 2* длиной в 520 п.о., структура которого была опубликована

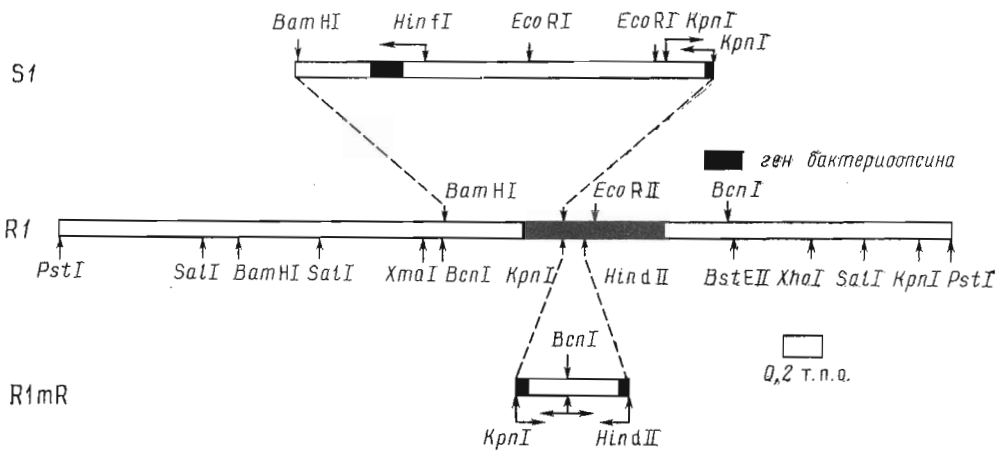


Рис. 1. Физическая рестриктная карта *Pst*I-фрагментов, содержащих ген бактериоопсина, из штаммов *H. halobium* RI (эквивалент дикого типа), S1 и R1mR. Горизонтальными стрелками обозначены участки цепей ДНК, первичная структура которых была определена методом Максама – Гилберта

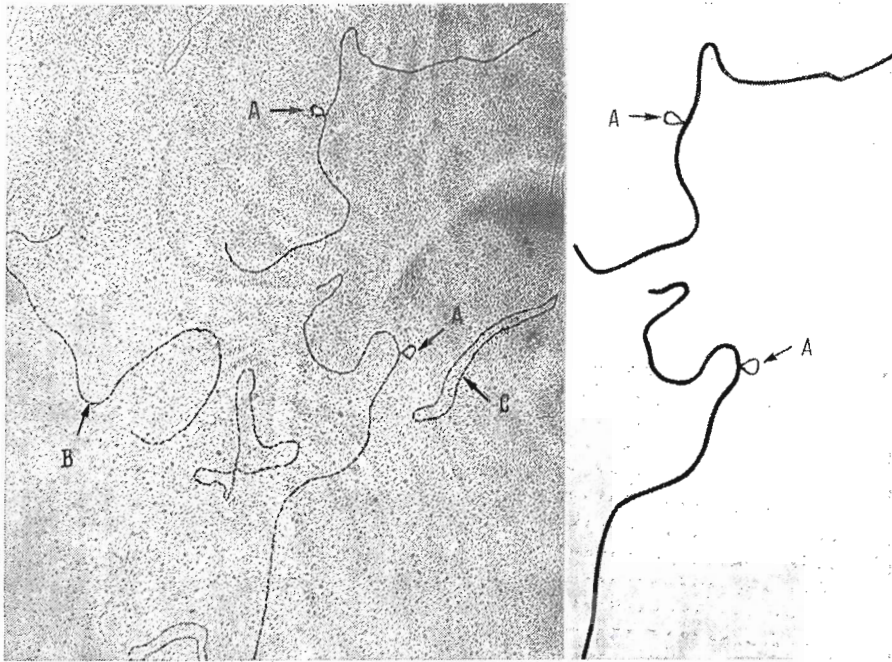


Рис. 2. Электронная микрофотография гетеродуплекса, образованного между ДНК плазмид pZK1S1 и pZK1R1, рестрицированных *Pvu*II. А – гетеродуплекс S1 – R1, В – линейная двухнитевая форма плазмиды, С – кольцевая форма плазмиды

ликована ранее [3]. Вставка *ISH* S1 не обнаруживает существенной гомологии своей целевой последовательности и фланговых обращенных повторов с таковыми у *ISH* 1, *ISH* 2 и *ISH* 50. Вставка *ISH* S1 не имеет аналогий и является четвертым *IS*-элементом *H. halobium*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Fox G. E., Stackebrandt E., Hespell R. B., Gibson J., Maniloff J., Dyer T. A., Wolfe R. S., Balch W. E., Tanner R. S., Magrum L. J., Zablen L. B., Blackmore R., Gupta R., Bonen L., Lewis B. J., Stahl D. A., Luehrsen K. R., Chen K. N., Woese C. R. *Science*, 1980, v. 209, № 4455, p. 457–463.
2. Oesterhell D., Stoeckenius W. *Nature New Biol.*, 1971, v. 233, № 39, p. 148–152.
3. DasSarma S., RajBhandary U. L., Khorana H. G. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1983, v. 80, № 8, p. 2201–2205.

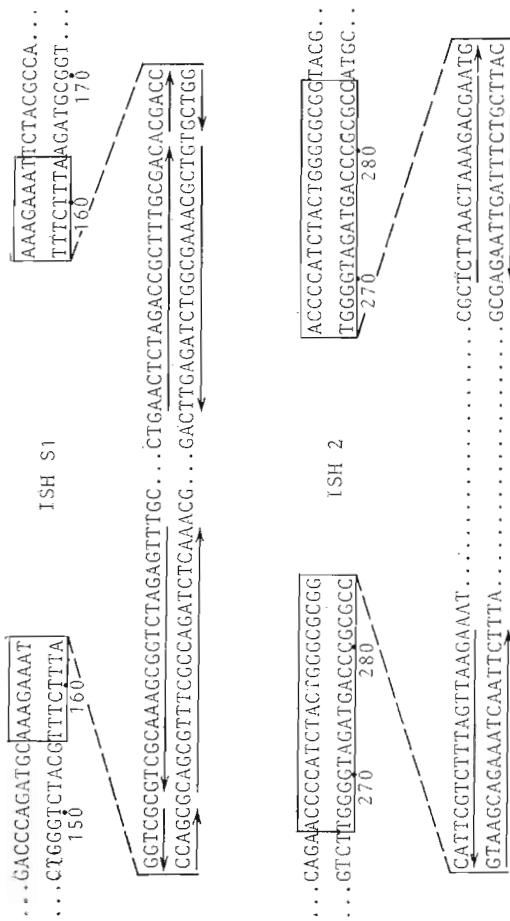
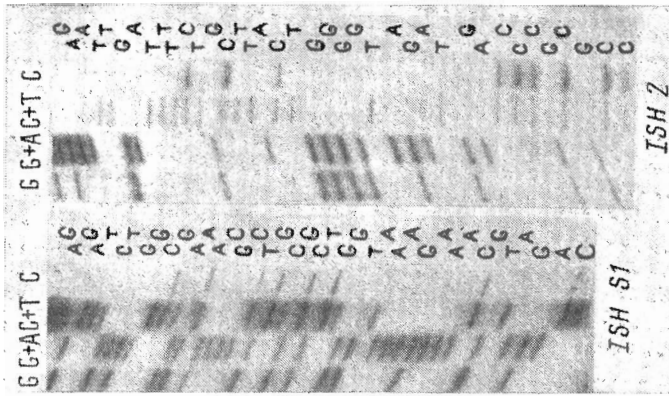


Рис. 3. Схемы встройки элементов *ISH S1* и *ISH 2* и последовательности их конечных участков. Дуплицированный целевой сайт заключен в рамку. Обратные повторяющиеся последовательности показаны стрелками. Нумерация нуклеотидов начинается с инициаторного кодона гена бактериолизина. Справа приведены радиоавтографы структурных генов *ISH S1* и *ISH 2*

4. Calos M. P., Miller J. H. Cell, 1980, v. 20, № 3, p. 579–595.
5. Зозуля С. А., Зайцева Е. М., Свердлов Е. Д. Биооргани. химия, 1984, т. 10, № 1, с. 124–126.
6. Maxam A. M., Gilbert W. A. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1977, v. 74, № 2, p. 560–564.
7. Simsek M., DasSarma S., RajBhandary U. L., Khorana H. G. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1982, v. 79, № 23, p. 7268–7272.
8. Xu W. L., Doolittle W. F. Nucl. Acids Res., 1983, v. 11, № 12, p. 4195–4199.

Поступило в редакцию
1.XII.1983

THE NEW *IS* ELEMENT OF *HALOBACTERIUM HALOBIUM*
LOCALIZED WITHIN THE BACTERIOOPSIN GENE

OVCHINNIKOV Yu. A., ZOZULYA S. A., ZAITSEVA E. M., GURIEV S. O.,
SVERDLOV E. D., KRUPENKO M. A.,* ALEKSANDROV A. A.**

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow;** *Institute of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, Moscow;***
Institute of Molecular Genetics, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

Two *IS* element-like inserts were localized by restriction analysis and heteroduplex electron microscopy within the bacterioopsin gene coding sequences cloned from *H. halobium* strains *S1* and *R1mR*. The primary structures of flanking regions of these inserts were determined by the Maxam – Gilbert method. The *IS* element from the *R1mR* strain is identical to *ISH2* (0,52 kbp) described earlier, while the *IS* element from the *S1* strain (1,7 kbp), called *ISH S1*, has no analogy.