



УДК 577.152.361*3:577.112.5

**ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА α -СУБЪЕДИНИЦЫ
Na⁺, K⁺-АТФ-азы ПОЧЕК СВИНЬИ****III *. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОЛНОЙ НУКЛЕОТИДНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ,
СООТВЕТСТВУЮЩЕЙ СТРУКТУРНОЙ ЧАСТИ ГЕНА**

*Монастырская Г. С., Броуде Н. Е., Мелков А. М.,
Смирнов Ю. В., Малышев И. В., Арсенин С. Г.,
Саломатина И. С., Свердлов В. Е., Гришин А. В.,
Петрухин К. Е., Модяков Н. Н.*

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

Определена нуклеотидная последовательность кДНК, соответствующей транскрибируемой области мРНК α -субъединицы Na⁺, K⁺-АТФ-азы почек свиньи. Эта область содержит 3063 п.о. и кодирует белок, состоящий из 1021 аминокислотного остатка. В результате процессинга с N-конца отщепляется пять аминокислотных остатков. Таким образом, процессированная α -субъединица Na⁺, K⁺-АТФ-азы содержит 1016 аминокислот.

В предыдущих сообщениях этой серии [1, 2] были опубликованы данные структурного анализа гидрофильных пептидов, полученных в результате ограниченного триптического гидролиза α -субъединицы Na⁺, K⁺-АТФ-азы (КФ 3.6.1.3) в составе мембраносвязанного фермента, а также описан процесс выделения, обратной транскрипции и клонирования матричной РНК, кодирующей α -субъединицу Na⁺, K⁺-АТФ-азы.

Настоящая работа посвящена определению полной нуклеотидной последовательности, соответствующей структурной части гена.

**Выделение плазмидной ДНК, ее анализ
и переклонирование в фаговый вектор**

Скрининг библиотеки клонов ($2 \cdot 10^5$ независимых клонов) с помощью специфического зонда, синтезированного в соответствии со структурой пептида [2], позволил выявить около 50 клонов, дающих положительный сигнал гибридизации [1]. Для их дальнейшего анализа проводили выделение плазмидной ДНК по методу Бирнбойма и Доли [3]. Выход материала, который дает метод, и степень его чистоты достаточны для того, чтобы использовать рекомбинантную плазмидную ДНК в последующих энзиматических реакциях.

Плазмидную ДНК из 50 отобранных таким образом клонов обрабатывали рестриктазой *Pst*I и определяли размер вставок электрофорезом в агарозном геле. Затем, после переноса ДНК на нитроцеллюлозный фильтр, проводили гибридизацию со специфическим зондом. С помощью рестрикционного анализа было показано, что вставки в плаزمидях pB5401, pB2302 и pB2801 имеют наибольшую длину — 1,2; 1,3 и 1,7 тыс. п.о. соответственно. В связи с этим данные плазмиды были выбраны для секвенирования. Была определена нуклеотидная последовательность 9 перекрывающихся фрагментов гена α -субъединицы из различных клонов, сумма которых составляла около 2700 нуклеотидов. Для поиска N- и C-концевых последовательностей кДНК Na⁺, K⁺-АТФ-азы были синтезированы зонды, соответствующие последовательностям, ближайшим к 3'- и 5'-концам клонов pB5401 и pB2801.

* Сообщение II см. [1].

1-15 AGGACC CGCGCGGACACACAGACCAGCCGCACT ATG GCG AAG GGG GTT Met-Gly-Lys-Gly-Val-
 (-5)-(-1)
 16-90 GGA CCC GAT AAA TAT GAG CCC GCA GCC GTG TCA GAG CAT GGC GAC AAA AAG AAG GCC AAG GAG AGG GAT ATG
 1-25 Gly-Arg-Asp-Lys-Tyr-Glu-Pro-Ala-Ala-Val-Ser-Glu-His-Gly-Asp-Lys-Lys-Ala-Lys-Lys-Glu-Arg-Asp-Met
 91-165 GAT GAG CTG AAG AAG GAA GTT TCT ATG GAT GAC CAT AAA CTT AGC CTT GAT GAG CTT CAT CGC AAA TAC GGA ACG
 26- 50 Asp-Glu-Leu-Lys-Lys-Glu-Val-Ser-Met-Asp-His-Lys-Leu-Ser-Leu-Asp-Glu-Leu-His-Arg-Lys-Tyr-Gly-Thr-
 166-240 GAC TTG AGC CGA GGG TTA ACA CCT GCT CGA GCT GAG ATC CTA GCC CGA GAC GGT CCC AAT GCC CTG ACA CCC
 51- 75 Asp-Leu-Ser-Arg-Gly-Leu-Thr-Pro-Ala-Arg-Ala-Ala-Glu-Ile-Leu-Ala-Arg-Asp-Gly-Pro-Asp-Ala-Leu-Thr-Pro-
 241-315 CCA CCC ACA ACC CCT GAA TGG GTC AAG TTC TGT CGG CAG CTC TTC GGA GGC TTC TCC ATG TTA CTG TGG ATC GGA
 76-100 Pro-Pro-Thr-Thr-Pro-Glu-Trp-Val-Lys-Phe-Cys-Arg-Gln-Leu-Phe-Gly-Gly-Phe-Ser-Met-Leu-Leu-Trp-Ile-Gly-
 316-390 GCG AAT CTT TGT TTC TTG GCC TAT GGC ATT CAA GCT GCT ACA GAA GAG GAA CCT CAA AAT GAT AAT CTG TAC CTT
 101-125 Ala-Ile-Leu-Cys-Phe-Leu-Ala-Tyr-Gly-Ile-Gln-Ala-Thr-Glu-Glu-Pro-Gln-Asn-Asp-Asn-Leu-Tyr-Leu-
 391-465 GGT GTG GTG CTC TCC GCC GTC ATC ATA ACT GGC TGT TTC TCC TAC TAT CAA GAA GCG AAA AGC TCA AAG ATC
 126-150 Gly-Val-Val-Leu-Ser-Ala-Val-Ile-Ile-Thr-Gly-Cys-Phe-Ser-Tyr-Tyr-Gln-Glu-Ala-Lys-Ser-Ser-Lys-Ile-
 466-540 ATG GAA TCC TTC AAA AAC ATG GTT CCT CAG CAA GCC CTC GTG ATT CGA AAT GGT GAA AAG ATG AGC ATA AAT GCA
 151-175 Met-Glu-Ser-Phe-Lys-Asn-Met-Val-Pro-Gln-Gln-Ala-Leu-Val-Ile-Arg-Asn-Gly-Glu-Lys-Met-Ser-Ile-Asn-Ala-
 541-615 GAG GAA GTC GTC GGC GAT CTG GTG GAG GGA GGA GGC GAT CGA ATC CCT GCT GAC CTC AGG ATC ATA TCT
 176-200 Glu-Glu-Val-Val-Gly-Asp-Leu-Val-Glu-Val-Lys-Gly-Asp-Arg-Ile-Pro-Ala-Asp-Leu-Arg-Ile-Ile-Ser-
 616-690 CCG AAC GGC TGC AAG GTG GAC AAC TCC TCC ACT GGT GAA TCA GNA CCG CAG ACC AGG TCT CCA GAT TTC ACC
 201-225 Ala-Asn-Gly-Cys-Lys-Val-Asp-Asn-Ser-Ser-Leu-Thr-Gly-Glu-Ser-Glu-Pro-Gln-Thr-Arg-Ser-Pro-Asp-Phe-Thr-
 691-765 AAT GAG AAC CCC CTG GAG ACT AGG AAC ATC GCC TTT TTT TCA ACC AAC TGC GTT GAA GGC ACT GCA CGT GGT AIT
 226-250 Asn-Glu-Asn-Pro-Leu-Glu-Thr-Arg-Asn-Ile-Ala-Phe-Ser-Thr-Asn-Cys-Val-Glu-Gly-Thr-Ala-Arg-Gly-Ile-
 766-840 GTG GTG TAC ACT GGC GAT CGC ACC GTG ATG GGC AGA ATC GCT ACC CTT GCT TCC GGG CTG GAA GGG GGC CAG ACT
 251-275 Val-Val-Tyr-Thr-Gly-Asp-Arg-Thr-Val-Met-Gly-Arg-Ile-Ala-Thr-Leu-Alu-Ser-Gly-Leu-Glu-Gly-Gln-Thr-
 841-915 CCC ATC GCT CGC GAG ATT GAA CAT TTT ATC CAC ATC ATC ACG GGC GTG GGC TTC CTC CGC CTC TTC TTC TTC
 276-300 Pro-Ile-Ala-Ala-Glu-Ile-Glu-His-Phe-Ile-His-Ile-Ile-Thr-Gly-Val-Ala-Val-Phe-Leu-Gly-Val-Ser-Phe-Ile-
 916-990 ATC CTT TCT CTG ATC CTC GAG TAC ACC TGG CTC GAG GCC GTC ATC TTC CTC ATC GGC ATC ATT GTA CCC AAC GIG
 301-325 Ile-Leu-Ser-Leu-Ile-Leu-Glu-Tyr-Thr-Trp-Leu-Glu-Ala-Val-Ile-Phe-Leu-Ile-Gly-Ile-Ile-Val-Ala-Asn-Val-
 991-1065 CCT GAA GGT TTG CTG GCC ACC GTC ACC GTG TCC TTG ACC CTG ACT GCC AAG CCC ATG GCC AGG AAG AAC TCC CTT
 326- 350 Pro-Glu-Gly-Leu-Leu-Ala-Thr-Val-Thr-Val-Cys-Leu-Thr-Ala-Lys-Arg-Met-Ala-Arg-Lys-Asn-Cys-Leu-

1066-1140 GTG AAG AAC TTG GAG GCT GTG GAG ACC CTG GGG TCC ACA TCC ACC ATC TGC TCA GAC AAA ACC GGA ACC CTC ACC
 351- 375 Val-Lys-Asn-Leu-Glu-Ala-Val-Glu-Thr-Lys-Ser-Thr-Ile-Cys-Ser-Asp-Lys-Thr-Gly-Thr-Leu-Thr-
 1141-1215 CAG AAC CGA ATG ACA GTG GCC CAC ATG TGG TTC GAC AAT CAA ATC CAC GAG GCT GAC ACG AAT CAG AGC
 376- 400 Gln-Asn-Arg-Met-Thr-Val-Ala-His-Met-Trp-Phe-Asp-Asn-Gln-Ile-His-Glu-Ala-Asp-Thr-Thr-Glu-Asn-Gln-Ser-
 1216-1290 GGT GTC TCA TTC GAC AAG ACT TCG GCC ACC TGG CTT GCT CTG TCC AGA ATT GCA GGT CTT TGT AAC AGG GCA GTG
 401- 425 Gly-Val-Ser-Phe-Asp-Lys-Thr-Ser-Ala-Thr-Trp-Leu-Ala-Thr-Trp-Leu-Ser-Arg-Ile-Ala-Gly-Leu-Cys-Asn-Arg-Ala-Val-
 1291-1365 TTC CAG GCC AAC CAG GAA AAC CTA CCT ATC CTG AAG CGG GCA GTG CGC GGC GAC GCC TCC GAG TCC CGC CTC TTA
 426- 450 Phe-Gln-Ala-Asn-Gln-Glu-Asn-Leu-Leu-Lys-Arg-Ala-Val-Ala-Gly-Asp-Ala-Ser-Glu-Ser-Ala-Leu-Leu-
 1366-1440 AAG TGC ATC GAG CTG TGC TGT GGG TCC TTG AAG GAG ATG AGG GAG CGA TAC ACC AAG TTC GTC GAG ATT CCC TTC
 451- 475 Lys-Cys-Ile-Glu-Leu-Cys-Gly-Ser-Val-Lys-Glu-Met-Arg-Glu-Tyr-Thr-Lys-Ile-Val-Glu-Ile-Pro-Phe-
 1441-1515 AAC TCC ACC AAC AAG TAC CAG CTG TCC ATC CAC AAG AAC CCC AAC ACG GCT GAG CCC CGG CAC CTG CTG GTG ATG
 476- 500 Asn-Ser-Thr-Asn-Lys-Tyr-Gln-Leu-Ser-Ile-His-Lys-Asn-Pro-Asn-Thr-Ala-Glu-Pro-Arg-His-Leu-Leu-Val-Met-
 1516-1590 AAA GGT GCT CCA GAA AGG ATC CTG GAC CGC TGC ACC TUC ATC CTC CAC GGC AAG GAG CAG CCC CTA GAC GAG
 501- 525 Lys-Gly-Ala-Pro-Glu-Arg-Ile-Leu-Asp-Arg-Cys-Ser-Ile-Leu-Ile-His-Gly-Lys-Glu-Gln-Pro-Leu-Asp-Glu-
 1591-1665 GAG CTG AAG GAC GCC TTT CAG AAC GCC TAC CTG GAG CTC GGT GGC CTC GGG GAA CGC GTG CTG GGT TTC TGC CAC
 526- 550 Glu-Leu-Lys-Asp-Ala-Phe-Gln-Asn-Ala-Tyr-Leu-Glu-Leu-Gly-Lys-Leu-Gly-Val-Leu-Gly-Phe-Cys-His-
 1666-1740 CTT TTC CTG CCG GAC GAG CAG TTC CCC GAA GGC TTC CAG TTT GAC ACC GAC GAT GTG AAT TTC CCT CTC GAT AAT
 551- 575 Leu-Phe-Leu-Pro-Asp-Glu-Gln-Phe-Gln-Phe-Asp-Thr-Asp-Val-Asn-Phe-Pro-Leu-Asp-Asn-
 1741-1815 CTC TGC TTC GTT GGG CTC ATC TCC ATG ATT GAC CCA CGG CGG GCC GTC CCG GAT GCC GTG GGC AAA TGT CGA
 576- 600 Leu-Cys-Phe-Val-Gly-Leu-Ile-Ser-Met-Ile-Asp-Pro-Arg-Ala-Ala-Val-Pro-Asp-Ala-Val-Gly-Lys-Cys-Arg-
 1816-1890 ACG GCT GGC ATT AAG GTC ATC ATG GTC ACC GGC GAT CAT CCC ATC ACA GCC AAA GCC ATT GCC AAA GGT GTG GGC
 601- 625 Ser-Ala-Gly-Ile-Lys-Val-Ile-Met-Val-Thr-Gly-Asp-His-Pro-Ile-Thr-Ala-Lys-Ala-Ile-Ala-Lys-Gly-Val-Gly-
 1891-1965 ATC ATC TCG GAA GCC AAT GAA ACG GTC GAA GAC ATC GCT GCC CGC CTC AAC ATC CCA GTG ACG CAG GTG AAC CCC
 626- 650 Ile-Ile-Ser-Glu-Gly-Asn-Glu-Thr-Val-Glu-Asp-Ile-Ala-Ala-Arg-Leu-Asn-Ile-Pro-Val-Ser-Gln-Val-Asn-Pro-
 1966-2040 ACG GAT GCC AAG GCC TGC GTG CAT GCA ACG GAT CTG AAA GAC ATG ACC TCG GAG CAG CTG GAT GAC ATC TTG
 651- 675 Arg-Asp-Ala-Lys-Ala-Cys-Val-Val-His-Gly-Ser-Asp-Leu-Lys-Asp-Met-Thr-Ser-Glu-Gln-Leu-Asp-Ile-Leu-
 2041-2115 AAG TAC CAC ACG GAG ATC GTG TTT GCC CGG AGC TCT CCT CAG CAG AAG CTC ATC ATT GTG GAA GGC TGC CAG AGA
 676- 700 Lys-Tyr-His-Thr-Glu-Ile-Val-Phe-Ala-Arg-Thr-Ser-Pro-Gln-Gln-Lys-Leu-Ile-Val-Glu-Gly-Cys-Gln-Arg-

2116-2190 CAG GGC GCC ATC GTG GCC GTG ACT GGC GAC GGT GTC AAT GAC TCT CCC GCT CUC AAG AAC GCA GAC ATC GGG GTT
 701- 725 Gln-Gly-Ala-Ile-Val-Ala-Val-Thr-Gly-Asp-Gly-Val-Asn-Asp-Ser-Pro-Ala-Leu-Lys-Lys-Ala-Asp-Ile-Gly-Val-
 2191-2265 GCC ATG GGG ATT GCT GGC TCG CAC GAG CAA GCT GCT GAC ATG ATC CTC CTG GAT GAC AAC TTC GCC TCC
 726- 750 Ala-Met-Gly-Ile-Ala-Gly-Ser-Asp-Val-Ser-Lys-Gln-Ala-Ala-Asp-Met-Ile-Leu-Leu-Asp-Asn-Phe-Ala-Ser-
 2266-2340 ATT GTG ACG GCA GTA GAG GAA GGT CCT CTG ATC TTT GAT AAC TTG AAG AAA TCC ATT GCC TAC ACC CTC ACC AGT
 751- 775 Ile-Val-Thr-Gly-Val-Glu-Gly-Arg-Leu-Ile-Phe-Asp-Asn-Leu-Lys-Lys-Ser-Ile-Ala-Tyr-Thr-Leu-Thr-Ser
 2341-2415 AAC ATT CCA GAG ATC ACC CCC TTC CTG AWA TTT ATT GCG AAC ATT CCA CTG CCC CTG GCC ACC CTC ACC ATC
 776- 800 Asn-Ile-Pro-Glu-Ile-Thr-Pro-Phe-Leu-Ile-Phe-Ile-Ile-Ala-Asn-Ile-Pro-Leu-Pro-Leu-Gly-Thr-Val-Thr-Ile-
 2416-2490 CTC TGC ATC GAC TTG GGC ACA GAC ATG GTT CCT GCT ACC TTC CCG TAT GAG CAG GCG GAG AGC GAC ATC ATG
 801- 825 Leu-Cys-Ile-Asp-Leu-Gly-Thr-Asp-Met-Val-Pro-Ala-Ile-Ser-Leu-Ala-Tyr-Glu-Gln-Ala-Glu-Ser-Asp-Ile-Met-
 2491-2565 AAG AGG CAG CCC CAG AAC CCC AAG ACA GAC AAA CTC GTC AAT GAG CAG CTC ATC AGC ATG GCC TAC GGA CAG ATA
 826- 850 Lys-Arg-Gln-Pro-Arg-Asn-Pro-Lys-Thr-Asp-Lys-Leu-Val-Asn-Glu-Gln-Leu-Ile-Ser-Met-Ala-Tyr-Gly-Gln-Ile-
 2566-2640 GGT ATG ATC CAG GCC CTG GGC TTC TTT TTT GTG ATC CTG GCT GAG AAC GGC TTC CTC CCG ATT CAC
 851- 875 Gly-Met-Ile-Gln-Ala-Leu-Gly-Gly-Phe-Thr-Thr-Phe-Val-Ile-Leu-Ala-Glu-Asn-Gly-Phe-Leu-Pro-Ile-His-
 2641-2715 CTG CTG GGC CTC CGG GTG AAC TGG GAT GAC CGC TGG ATC AAC GAC CTG GAG AGC TAC GGG CAG CAG TCG ACC
 876- 900 Leu-Leu-Gly-Leu-Arg-Val-Asn-Trp-Asp-Arg-Trp-Ile-Asn-Asp-Val-Glu-Asp-Ser-Tyr-Gly-Gln-Gln-Trp-Thr-
 2716-2790 TAC GAA CAG AGG AAG ATC GTG GAG TTC ACC TGC CAC ACG GCC TTC TTT GTC ACC ATC GTG GTG CAG TGG GCC
 901- 925 Tyr-Glu-Gln-Arg-Lys-Ile-Val-Glu-Phe-Thr-Cys-His-Thr-Ala-Phe-Val-Ser-Ile-Val-Val-Gln-Trp-Ala-
 2791-2865 GAC TTG GTC ATC TGC AAG ACC CGG AGG AAT TCC GTC TTC CAG CAG GGG ATG AAG AAC AAA ATC TTG ATC TTT GGC
 926- 950 Asp-Leu-Val-Ile-Cys-Lys-Thr-Arg-Arg-Asn-Ser-Val-Phe-Gln-Gln-Gly-Met-Lys-Asn-Lys-Ile-Leu-Ile-Phe-Gly-
 2866-2940 CTC TTC GAA GAG ACG GCC CTG GCT TTC CTC TCC TAC TGC CCC GGA ATG GGC GTG GCC CTG AGG ATG TAC CCC
 951- 975 Leu-Phe-Glu-Glu-Thr-Ala-Leu-Ala-Phe-Leu-Leu-Ser-Tyr-Cys-Pro-Gly-Met-Gly-Val-Ala-Leu-Arg-Met-Tyr-Pro-
 2941-3015 CTC AAA CCT ACC TGG TTC TGT GCC TTC CCC TAC TCG CTC CTC ATC TTC GTC TAT GAC GAA GTC AGG AAG CTC
 976-1000 Leu-Lys-Pro-Thr-Trp-Phe-Cys-Ala-Phe-Pro-Tyr-Ser-Leu-Leu-Ile-Phe-Val-Tyr-Asp-Glu-Val-Arg-Lys-Leu-
 3016-3066 ATC ATC AGG CGA CGC CCT GGC GGC TGG GTG GAG AAG GAA ACC TAC TAC TAG ACCCCCTCTCCACGCCG
 1001-1016 Ile-Ile-Arg-Arg-Arg-Pro-Gly-Gly-Trp-Val-Glu-Lys-Glu-Thr-Tyr-Tyr

Рис. 2. Нуклеотидная последовательность кодирующей цепи кДНК и аминокислотная последовательность α -субъединицы Na^+ , K^+ -АТФ-азы. Подчеркнуты аминокислотные последовательности, структура которых установлена методами белковой химии

и использованных для дополнительного скрининга библиотек кДНК, соответствуют (787—803) и (2833—2849).

Все пептиды, выделенные при гидролизе α -субъединицы, структура которых была определена пептидным анализом, были найдены в последовательности кДНК в одной и той же рамке считывания. Сайт инициации трансляции был отнесен к кодопу АТГ с координатами (—15—13). Это предполагает, что первоначальный продукт трансляции гена α -субъединицы на пять аминокислот длиннее зрелого белка, N-концевая последовательность которого известна как Cly-Arg-Asp-Lys-Tyr.

Первый терминаторный кодон расположен на расстоянии 3063 п.о. от инициаторного кодона. Аминокислотная последовательность, предшествующая терминатору (ТАС), полностью соответствует структуре одного из триптических пептидов белка, что свидетельствует об отсутствии процессинга в С-концевой области полипептидной цепи.

Таким образом, полная нуклеотидная последовательность структурной части гена α -субъединицы Na^+ , K^+ -АТФ-азы свиньи составляет 3063 п. о., и ген кодирует зрелый белок, состоящий из 1016 аминокислотных остатков.

Экспериментальная часть

В работе использовали: трис, формамид, ацетат натрия (Merck, ФРГ), EDTA, MgCl_2 , β -меркаптоэтанол (Sigma, США); додецилсульфат натрия, акриламид, N,N-метиленбисакриламид, персульфат аммония, TEMED (Bio-Rad, США); дезоксицуклозидтрифосфаты, дидезоксицуклозидтрифосфаты, тРНК (Boehringer, ФРГ), [γ - ^{32}P]АТФ (уд. акт. > 5000 Ки/ммоль; Amersham, Англия), агарозу, лизоцим, бромид этидия (Sigma, США); нитроцеллюлозные фильтры BA 85 (Schleicher und Schüll, ФРГ), ватман ЗММ (Whatmann, Англия); ферменты — рестриктазы (Boehringer, ФРГ), ДНК-лигазу; щелочную фосфатазу, полинуклеотидкиназу, фрагмент Кленова (выделены А. В. Честухиным, ИБХ АН СССР). Остальные соли и растворители производства «Союзреактив».

Плазмидную ДНК выделяли по методу Бирнбойма и Доли [3].

Гибридизацию ДНК клонов с олигонуклеотидными зондами проводили по методике, описанной ранее [1].

Для субклонирования использовали векторы M13mp18 и M13mp19. Использование данной пары векторов продиктовано необходимостью секвенирования обеих цепей субклонированных фрагментов ДНК, содержащих различные сайты рестрикции на концах вставки. Такая ситуация возникала при субклонировании концевых фрагментов, когда с одного конца был сайт *Pst*I, а с другого — сайт одной из рестриктаз полилинкерного участка вектора. Условия субклонирования описаны ранее [4].

Отличие использованной в работе модифицированной методики секвенирования [5] от классического метода Сенгера [4] заключается в том, что синтез новой цепи происходит без меченого дезоксицуклозидтрифосфата, а радиоактивная метка вводится в 5'-конец универсального праймера с помощью полинуклеотидкиназы и [γ - ^{32}P]АТФ.

При отжиге 1,5–2 мкг матричной ДНК смешивали с 2–3 пмоль меченого праймера (конечный объем реакционной смеси составлял 10 мкл), выдерживали 3 мин при 70°С, а затем медленно охлаждали до комнатной температуры. Для реакции полимеразного копирования к 2 мкл фаговой ДНК с отожженным праймером добавляли 2 мкл смеси dNTP/ddNTP и 1 мкл (1 ед. акт.) фрагмента Кленова ДНК полимеразы I и инкубировали 20 мин при 37°С. После добавления 3 мкл смеси красителей с формамидом реакционную смесь денатурировали 20 мин при 80°С и наносили на денатурирующий полиакриламидный гель, как описано ранее [7]. Электрофорез проводили при 25 мА и 50°С. После перенесения на бумагу и высушивания гель экспонировали 6–15 ч с рентгеновской пленкой РМ-В.

Авторы выражают искреннюю благодарность Ю. А. Овчинникову и Е. Д. Свердлову за постоянное внимание и поддержку в работе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Петрухин К. Е., Броуде Н. Е., Арсенян С. Г., Гришин А. В., Джанджугазян К. Н., Модянов Н. Н. Биоорг. химия, 1985, т. 11, № 12, с. 1607–1613.
2. Арзамасова Н. А., Аристархова Е. А., Шафиева Г. И., Назимов И. В., Алданова Н. А., Модянов Н. Н. Биоорг. химия, 1985, т. 11, № 12, с. 1598–1606.
3. Birnbaum H., Doly J. Nucl. Acid Res., 1979, v. 7, p. 1513–1522.
4. Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1977, v. 74, p. 5463–5767.
5. McGraw R. A. Anal. Biochem., 1984, v. 143, № 2, p. 298–303.

6. Овчинников Ю. А., Монастырская Г. С., Арсенян С. Г., Броуде Н. Е., Петрухин К. Е., Гришин А. В., Арзамасова Н. М., Северцова И. В., Модянов Н. Н. Докл. АН СССР, 1985, т. 283, № 5, с. 1278—1280.
7. Garoff H., Ansorge W. Anal. Biochem., 1981, v. 115, p. 450—457.

Поступила в редакцию
25.VII.1986

**THE PRIMARY STRUCTURE OF THE α -SUBUNIT OF Na⁺, K⁺-ATPase.
III. THE COMPLETE NUCLEOTIDE SEQUENCE CORRESPONDING TO THE
CODING PART OF THE GENE**

MONASTYRSKAYA G. S., BROUDE N. E., MELKOV A. M., SMIRNOV Yu. V.,
MALYSHEV I. V., ARSENYAN S. G., SALOMATINA I. S., SVERDLOV V. E.,
GRISHIN A. V., PETRUKHIN K. E., MODYANOV N. N.

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

The nucleotide sequence of the cDNA, containing coding region of the α -subunit of the pig kidney Na⁺, K⁺-ATPase, was determined. The region contains 3063 b.p. coding for 1021 amino acid residues. In the course of processing, five amino acid residues are cleaved to yield the mature Na⁺, K⁺-ATPase α -subunit containing 1016 amino acid residues.