



УДК 577.214.622:577.113.5

ГЕНЫ, КОДИРУЮЩИЕ РНК-ПОЛИМЕРАЗУ БАКТЕРИЙ

III. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МОДИФИЦИРОВАННОГО МЕТОДА СЕНГЕРА
ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПЕРВИЧНОЙ СТРУКТУРЫ
С-КОНЦЕВОЙ ОБЛАСТИ ГЕНА *rpoB*, N-КОНЦЕВОЙ ОБЛАСТИ ГЕНА
rpoC И МЕЖЦИСТРОННОГО УЧАСТКА РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ
*Pseudomonas putida*Бородин А. М., Данилкович А. В., Чернов И. П.,
Ажикина Т. Л., Ростопилов В. М., Монастырская Г. С.Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва

При анализе первичной структуры ДНК по Сенгеру (метод синтетических праймеров) обнаружено, что примеси $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ и ADP к праймеру не влияют на эффективность репликации в присутствии ddNTP. Это позволило исключить стадию очистки праймеров осаждением и применить метод синтетических праймеров, радиоактивно меченных по 5'-концу, для определения нуклеотидной последовательности *SalI*-С-фрагмента *rpoBC*-оперона *Pseudomonas putida*.

Ранее мы сообщали о клонировании *rpoBC*-оперона *Pseudomonas putida*, кодирующего β - и β' -субъединицы РНК-полимеразы, для проведения структурно-эволюционного анализа [1]. Для определения нуклеотидной последовательности *SalI*-С-фрагмента *rpoBC*-оперона, включающего С-концевую часть гена *rpoB*, N-концевую часть гена *rpoC* и межцистронный участок, использовали метод синтетических праймеров [2, 3], радиоактивно меченных по 5'-концу [4]. Применение радиоактивно меченных праймеров вместо $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{NTP}$ выгодно тем, что при этом можно использовать менее очищенную матричную ДНК [5]. Мы обнаружили, что $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ и ADP, содержащиеся в реакционной смеси при кинировании праймеров, не влияют на эффективность репликации в присутствии терминирующих аналогов dNTP, и исключили их удаление, которое обычно осуществляется путем осаждения праймера в этаноле в присутствии тРНК [4].

Гомология праймера и матричной ДНК во вторичных участках отжига должна быть минимальной [2]. В наших экспериментах она не превышала 66%, появления неспецифических полос при таком предельном параметре не наблюдалось. На рисунке представлены результаты структурного анализа фрагмента *SalI*-С длиной 2492 п.о. В него входят 966 п.о., кодирующих С-концевую часть гена *rpoB*, и 1493 п.о., кодирующих N-концевую часть гена *rpoC*. Интересной особенностью *rpoBC*-оперона *P. putida* является структура межцистронного участка: его длина составляет лишь 30 п.о. (у *E. coli* — 76 п.о. [6]), причем гены *rpoB* и *rpoC* расположены в одной рамке считывания, а межцистронный участок не содержит дополнительных терминирующих кодонов. За 11 п.о. перед инициирующим кодоном гена *rpoC* (AUG, у *E. coli* — GUG) расположена предполагаемая SD-последовательность 5'GGAG3' [7]. Структура межцистронного участка может свидетельствовать о различии механизмов регуляции экспрессии *rpoBC*-оперона у *P. putida* и *E. coli*.

Структурно-эволюционный анализ генов *rpoB* и *rpoC* *P. putida* будет приведен позднее.

Экспериментальная часть

Флигодезоксинуклеотидные праймеры (18- и 20-звенные) синтезировали фосфитным методом; их снятие с полимера, удаление защитных групп и очистку проводили как описано в работе [8]. Препаративное и аналитическое выделение ДНК фага

30 60
 GTCGACCGTCGCCGTCTGCTGGACGACAAGTTCGAAGACAAGAACGGCAACCTGGCAGCAG
 V D R R R L L D D K F E D K K R N V Q Q

90 120
 GGCGATGACCTGGCACCGGGCTACTGAAGATCGTCAAGGTTTACCTTGCATTCGGCCGC
 G D D L A P G V L K I V K V Y L A I F R

150 180
 CGCATCCAGCCGGGTGACAAGATGGCCGCTCGTACCGGTAACAAGGGTGTCTCTCGGTTC
 R I C P G D K M A G R H G N K G V V S V

210 240
 ATCATGCCGGTTGAAGACATGCCGCACGATGCCAACGGTACTCCGGTTGACSTGGTACTG
 T M P V E D M P H D A N G T P V D V V L

270 300
 AACCCGCTGGCTGTACCTTCGGTATGAACGTTGCTCAGATCCTTGAACCCGCTTGGCC
 N P L G V P S R M N V G Q I L E T H L G

330 360
 CTCGGGGCAAGGGTTCGGCGAGAAGATCGACCGCATGCTCGAAGAGCAGCGTAAAGCC
 L A A K G L G E K I D R M L E E C E K A

390 420
 GCTGACCTGCGCGTTCCTGACCGAGGCTTACAACGAGATCGGGCGCTGCTCAGGAAAC
 A E L R V F L T E V Y N E I G G R C E N

450 480
 CTCGACGACTTCAACGACGAAGAAGTCTTGGCCCTGGCTAACCACTGAAGAAAGCCCTG
 L D E F N D E E V L A L A N N L K R G V

510 540
 CCTATGGCTACCCGGTCTTCGATGGTGCACCAAGGAGCGCGAGATCAAGCCATGCTGAAG
 P M A T P V F D G A K E R E I K A M L K

570 600
 CTGGCCGACCTGCCAGAGAGCGGCCAGATGGTGCCTGTCGATGGCCGTACCCGSAACAAG
 L A D L P E S G Q M V L F D G R T E N K

630 660
 TCCGAGCGTCTGTGACCGTGGTTAGATGTACATGCTCAAGCTGAACCACTTGGTGGAC
 S E R P V T V G Y M Y M L K L N H L V D

690 720
 GACAAGATGCACGCGCGTTCCTACTGGTTCTTACAGCCCTGGTTACCCAGCAGGCTCTGGGT
 D K M H A R S T G S Y S L V T Q Q P L G

750 780
 GGTAAAGCGCAGTTTCGGTGGTACGCGTTTCGGGGAGATCGAAGTGTGGCCGCTGSAAGCA
 G K A Q F G G Q R F G E M E V W A L E A

810 840
 TACGGCGCGGCATACACCCCTGCAAGAAATGCTCACAGTGAAGTTCGGACGACGCTGAACCGC
 Y G A A Y T L Q E M L T V K S D D V N G

870 900
 CGTACCAAGATGTACAAGAACAATCGTGGATGGCGATCACCGTATGGAGCCGGCATGGCC
 R T K M Y K N I V D G D H R N E P C M A

930 960
 GAGTCTTCAACGTTGATCAAAGAGATCCGTTCCGCTCGGTATCGATATCGATCTGGAA
 E S F N V L I K E I R S L G I D I D L E

Рисунок

990 1020
 ACCGAATAACACGTGACGCGAAGGGGAGTGGGGCAGGTAATGCTGCTCCCTGCCGCCA
 T E Ter M L L P A P P

1050 1080
 GGAGGAAAGGCCTTGAAAGACCTACTGATTTTGTCTGAAAAACCAGGGTCAAGTTCGAAGAG
 G G K A L K D L L N L L K N Q G Q V E E

1110 1140
 TTCGACGCCATCCGCATCGGTCTGGCGTCGCCTGAAATGATCCGTTCCGTGGTTCGTTCCGGT
 F D A I R I G L A S P E M I R S V S F G

1170 1200
 GAAGTTAAGAAGCCGGAAACCATCAACTACCGTACGTTCAAGCCTGAGCGTGACGGCCTG
 E V K K P E T I N Y R T F K P E R D G L

1230 1260
 TTCTGCGCCAAGATCTTTGGCCAGTCAAGGACTACGAGTGCCTGTGCGGCAAGTACAAG
 F C A K I F G P V K D Y E C L C G K Y K

1290 1320
 CGCGTCAAGCACCGCGGCTAATCTGCGAGAAGTCCGGCGTTGAAGTTGCCCTGGGCAAG
 R V K H R G V I C E K C G V E V A L G K

1350 1380
 GTTGCTGCTGAGCGCATGGGCCACATCGAGCTGGCCTGCGGCCTTGCCACATCTGGGTC
 V A A E R M G H I E L A C G L A H I W F

1410 1440
 CTGAAGTCGCTGCCGTCCCGTATCGGCTTGCTGATGGACATGACCCTCGTGATATCGAG
 L K S L P S R I G L L M D M T L R D I E

1470 1500
 CGCGTCTCTACTTCGAGAGCTATGTCGTTATCGACCCGGCATGACTACCTGGAAAAG
 R V L Y F E S Y V V I D P G M T T L E K

1530 1560
 GGCCAGCTGCTGAACGACGAGCAGTACTTCGAAGCGCTGGAAGAGTTCGGTGACGACTTC
 G Q L L N D E Q Y F E A L E E F G D D F

1590 1620
 GATGCCGCTATGGGGCCGAGGCTGTCGCGAGCTGCTGCACGCTACTGACCTGGAGCAC
 D A A M G A E A V R E L L H A T D L E H

1650 1680
 GAGATCGGCCCGCTGCGCGAAGAAATTCGCGAGACCAACTCGGAAACCAAGATCAAGAAG
 E I G P L R E E I P Q T N S E T K I K K

1710 1740
 CTTTCCAAGCGTCTGAAGCTGATGGAAGCTTTCCAGGGCATCGGCAACCTGCCTGAGTGG
 L S K R L K L M E A F Q G I G N L P E W

1770 1800
 ATGGTCTGACCGTCTCGCCAGTTCGTCGCGGACCACTCGGTCCGCTGGTTCGCTGGAT
 M V L T V L P V V P A P L G P L V P L D

1830 1860
 GGTGGCGGTTTCGCGACTTCCGACCTGAACGACCTGTATCGCCGGGTGATCAACCGTAAC
 G G R F A T S D L N D L Y R R V I N R N

1890 1920
 AACCGTCTGAAGCGCCAGCTGGATCTGTGCGCGCGGACATCATCGTCCGCAACGAAAAG
 N R L K R Q L D L S A P D I I V R N E K

Рисунок (продолжение)

M13mp11 осуществляли, основываясь на методиках [9]. Введение радиоактивной метки в праймер проводили в растворе (5 мкл), содержащем 2–3 пмоль праймера, 3 пмоль [γ - 32 P]АТФ (3000 Ки/ммоль), 0,1–1 ед. акт. Т4-полинуклеотидкиназы, 10 мМ трис-НСl (рН 8,3), 7 мМ MgCl₂, при 37° С в течение 30 мин. Отжиг праймера проходил в течение 15 мин при 55° С после добавления в реакционную смесь 2 мкг (7 мкл) матричной ДНК (M13mp11 с клонированным в обеих ориентациях фрагментом *Sal*I-C) и 1 мкл буфера (50 мМ трис-НСl (рН 8,3), 35 мМ MgCl₂). Реакцию по Сенгеру проводили 15 мин при 37° С в смеси следующего состава: 3 мкл раствора матричной ДНК с отожженным праймером, 2 мкл смеси dNTP/ddNTP [4], 1 мкл (1 ед. акт.) фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I. После добавления 1 мкл смеси четырех dNTP (2,5 мМ раствор каждого) реакцию инкубировали 15 мин при 37° С. Все остальные процедуры осуществляли по стандартным методикам [9]. Время экспозиции радиоавтографов составляло 5–10 ч.

1950 1980
 CCGATGCTGCAGGAAGCGGTGAGCCCTCTGCTGGACAACGGCCCTGCGGTGTCGCCATC
 P N I Q E A V E P L L D N G A C G V A T

2010 2040
 ACTGGCTCGAACAAAGCGTCCGTCGAAGTCCCTGGCCGACATGATCAAAGGTAAGCAAGGT
 T G S N K R P S K S L A D M I K G K Q G

2070 2100
 CGTTTCCGTCAGAACTTGCTCGTAAGCGTGTGACTACTCCGGCCCTTCGGTAATTCC
 R F R Q N L L G K R V D Y S G R S V I S

2130 2160
 GTAGGTCCGACCTGCGTCTGCACCAGTGCGGTCTGCCGAAGAAGATGGCCCTCGACCTG
 V G P T L R L H Q C G L P K K M A L E L

2190 2220
 TTCAAACCCGTTTCATTTTCGGCAAGCTCGAAATGCGTGGTCTGGCGACCACCATCAAGGCT
 F K P F I F G K L E M R G L A T T I K A

2250 2280
 GCCAAGAAGATGGTCGAGCGCGAGCTGCCAGAGGTGTGGACGTTCTCGTGAAGTGATT
 A K K M V E R E L P E V W D V L A E V I

2310 2340
 CGCGAACACCCCGTACTGCTCAACCGTGCACCGACCCTTCACCGTCTGGGTATCCAGGCG
 R E H P V L L N R A P T L H R L G I Q A

2370 2400
 TTTGAACCCGTTACTGATCGAAGGTAAGGCTATTCAGTGCACCCGCTGGTCTGTGCTCGG
 F E P V L I E G K A I Q L H P L V C A R

2430 2460
 TACAACGCCGACTTCGACGGTGACCAGATGGCCGTTGACGTTTCTGATTCTGGAAGCC
 Y N A D F D G D Q M A V D V L L I L E A

2490
 CAGCTCGAGAACGGTGCCTGATGATGTCGAC
 Q L E N G A L M M S

Первичная структура С-концевой части гена *rpoB*, межцистронного участка, N-концевой части гена *rpoC* и соответствующие им аминокислотные последовательности

ЛИТЕРАТУРА

1. Бородин А. М., Данилкович А. В., Алликметс Р. Л., Монастырская Г. С. // Биоорганическая химия. 1988. Т. 14. № 4. С. 560–562.
2. Sanchez-Peskador R., Urdea M. S. // DNA. 1984. V. 3. № 4. P. 339–343.
3. Strauss E. C., Kobori J. A., Siu J., Hood L. E. // Anal. Biochem. 1986. V. 154. № 1. P. 353–360.
4. McGraw R. A. // Anal. Biochem. 1984. V. 143. № 2. P. 298–303.
5. Eperon I. C. // Anal. Biochem. 1986. V. 156. № 2. P. 406–412.
6. Овчинников Ю. А., Монастырская Г. С., Губанов В. В., Гурьев С. О., Чертов О. Ю., Модянов Н. Н., Гринкевич В. А., Макарова И. А., Марченко Т. В., Половникова И. Н., Липкин В. Н., Свердлов Е. Д. // Докл. АН СССР. 1980. Т. 253. № 4. С. 994–998.
7. Huysmans E., De Wochter R. // Nucl. Acids Res. 1986. V. 14. Suppl. r73–r118.
8. Gait M. J. Oligonucleotide Synthesis. Practical approach. Oxford: IRL-Press, 1984.
9. M13 Cloning and Sequencing Handbook. Amersham, 1984.

Поступила в редакцию
9.II.1988

GENES CODING FOR BACTERIAL RNA POLYMERASE. III. USE OF MODIFIED METHOD OF SANGER FOR SEQUENCING C-TERMINAL REGION OF *rpoB* GENE, INTERCISTRON REGION, *rpoBC* OPERON, AND N-TERMINAL REGION OF *rpoC* GENE OF *Pseudomonas putida*

BORODIN A. M., DANILKOVICH A. V., CHERNOV I. P., AZHYKINA T. L.,
 ROSTAPSHOV V. M., MONASTYRSKAYA G. S.

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

The Sanger method was modified and the primary structure of the *SalI* – C fragment of the *Pseudomonas putida* *rpoBC* operon was elucidated.