



УДК 577.113.5

КЛОНИРОВАНИЕ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПЕРВИЧНОЙ СТРУКТУРЫ кДНК, КОДИРУЮЩЕЙ ЦЕНТРАЛЬНУЮ ЧАСТЬ ФАКТОРА ЭЛОНГАЦИИ 2 ИЗ ПЕЧЕНИ КРЫСЫ

Олейников А. В., Джохадзе Г. Г.*, Алахов Ю. В.

Институт белка Академии наук СССР, Пушкино Московской обл.;

**Институт молекулярной биологии и биологической физики
Академии наук ГССР, Тбилиси*

Получен ряд клонов кДНК, суммарно кодирующих 417 аминокислотных остатков центральной части фактора элонгации 2 (ЕФ-2) из печени крысы. В качестве затравок для синтеза первой цепи клонируемых кДНК использовали олигодезоксирибонуклеотиды, комплементарные мРНК ЕФ-2. Структура этих олигонуклеотидов определялась по мере установления первичной структуры кДНК ЕФ-2 от 3'-к 5'-концу кодирующей нити. Такой метод синтеза специфической кДНК позволил существенно снизить число исследуемых рекомбинантных клонов для поиска клона кДНК ЕФ-2. Сравнение первичной структуры ЕФ-2 из печени крысы, выведенной из нуклеотидной последовательности, с опубликованной ранее первичной структурой ЕФ-2 из клеток зародышей китайского хомячка выявило одну аминокислотную замену — остатка глутаминовой кислоты (у ЕФ-2 хомячка) на остаток аспарагиновой кислоты. Гомология между последовательностями оснований в кДНК ЕФ-2 крысы и хомячка составила 89%. Норзерн-блот-анализ poly(A⁺)-мРНК из печени крысы выявил гибридизацию с мРНК длиной 3000 оснований. Обнаружен сильный стоп-сигнал для обратной транскриптазы в 5'-области мРНК ЕФ-2 из крысы — вероятность диссоциации фермента от матрицы не менее 97,5%.

Фактор элонгации 2 (ЕФ-2) катализирует транслокацию вновь синтезированной пептидил-тРНК из акцепторного участка на рибосоме в донорный, тем самым подготавливая белоксинтезирующий комплекс к следующему этапу наращивания полипептидной цепи. Этот белок, состоящий из одной полипептидной цепи с M_r 90 000 — 100 000, был выделен из различных эукариотических клеток. Недавно была установлена первичная структура этого белка из клеток зародышей китайского хомячка путем клонирования и секвенирования клона кДНК, целиком кодирующего ЕФ-2 [1]. В этой же работе установлена первичная структура С-концевой части (3'-концевая область мРНК) ЕФ-2 из печени крысы. Также недавно сообщалось о клонировании кДНК и определении первичной структуры С-концевой части ЕФ-2 человека [2]. В данной работе мы клонировали и секвенировали ряд клонов кДНК ЕФ-2 из печени крысы, суммарно кодирующих 417 аминокислотных остатков из центральной области белка.

Для клонирования полноразмерной ДНК, комплементарной интересующей мРНК, обычно используют кДНК, полученную с помощью oligo(dT)-затравки при синтезе первой цепи. Метод синтеза первой цепи кДНК с помощью специфической олигонуклеотидной затравки (так называемый метод primer-extension) используется иногда для клонирования и установления первичной структуры 5'-концевой части индивидуальных мРНК (например, [3, 4]). Мы полагаем, что этот метод можно с успехом применять для быстрого клонирования и секвенирования гораздо большей части, чем только 5'-концевая область, индивидуальных мРНК (особенно длинных и низкокопийных), если есть информация о мРНК в 3'-области (или о белке в С-концевой части). Безусловным преимуществом этого метода является получение препарата кДНК, сильно обогащенного интересующей кДНК по сравнению с кДНК, полученной с помощью oligo(dT)-прайма. Нет также необходимости в каком-либо предварительном фракционировании мРНК. Это позволяет находить клоны интересующей

кДНК среди относительно небольшого числа полученных гибридных клонов даже для низкокопийных матриц [3].

После установления первичной структуры наибольшего из полученных интересующих клонов можно опять применить этот же метод синтеза кДНК, используя в качестве затравки олигонуклеотид, комплементарный 5'-концевому участку установленной части мРНК. Таким образом можно быстро клонировать и секвенировать ряд клонов кДНК, перекрывающихся между собой и кодирующих интересующий белок вплоть до N-конца.

Предварительно мы провели нозерн-блот-анализ препарата poly(A⁺)-мРНК для проверки качества препарата РНК и установления размеров комплементарной зонды мРНК (рис. 1). Олигонуклеотид I (oligo-I) комплементарен мРНК EF-2 крысы (положение его в структуре кДНК EF-2 показано на рис. 2б). При гибридизации с олиго-I, использованным в дальнейшем для синтеза первой цепи кДНК, выявляется единственная мРНК длиной 3000 оснований (рис. 1), что соответствует сообщению Коно с сотр. [1].

Первоначально мы использовали 26-членный oligo-I для синтеза первой цепи кДНК [5]. Выход кДНК составлял 2—4% от количества мРНК (при этом с oligo(dT)-затравкой выход составлял 30—40% с этой же матрицей). После синтеза второй цепи с помощью ДНК-полимеразы I и РНКазы H полученную кДНК встраивали в плазмиду pBR322 по сайту *Pst*I коннекторным методом после добавления гомополимерных последовательностей [6]. Поиск клонов кДНК EF-2 в полученной специфической библиотеке рЕН, состоящей из 1200 клонов, проводили гибридизацией *in situ* с радиоактивно меченным oligo-II (см. рис. 2б). Для синтеза обоих нуклеотидов была использована информация о структуре 3'-концевого участка

мРНК EF-2 крысы, установленной в работе Коно с сотр. [1]. В результате поиска мы получили четыре клон кДНК EF-2 (рис. 2а). Заметим, что Коно с сотр. [1] для обнаружения одного клон кДНК EF-2 крысы исследовали неспецифическую библиотеку, состоящую из 50 000 клонов. Один из найденных нами клонов (рЕН 241b, рис. 2а) содержал кДНК EF-2 крысы длиной около 1100 п. о. Последовательность 1060 п. о. этой кДНК была установлена методом Сенгера [7] как на двухцепочечной ДНК [8] с использованием oligo-II в качестве праймера, так и после переклонирования рестриктных фрагментов этой кДНК в фаги M13mp8 и mp9 (рис. 3). Затем был синтезирован 21-членный oligo-III (положение в структуре кДНК см. на рис. 2а), комплементарный мРНК EF-2. После клонирования кДНК, полученной с помощью oligo-III в качестве затравки для синтеза кДНК, мы исследовали в гибридизации *in situ* с oligo-IV (см. рис. 2а) 8000 рекомбинантных клонов и обнаружили 40 клонов кДНК EF-2 (клоны серии рUC01-21). Характерной особенностью всех этих клонов после установления их размеров и первичной структуры методом Сенгера на двухцепочечной ДНК оказалось то, что они несли фрагменты кДНК EF-2 длиной не более 290 нуклеотидов. Варьирование длин (на 5'-концах) кодирующих цепей кДНК из различных клонов серии рUC01-21 (рис. 2а) составляло от нескольких нуклеотидов для большинства клонов

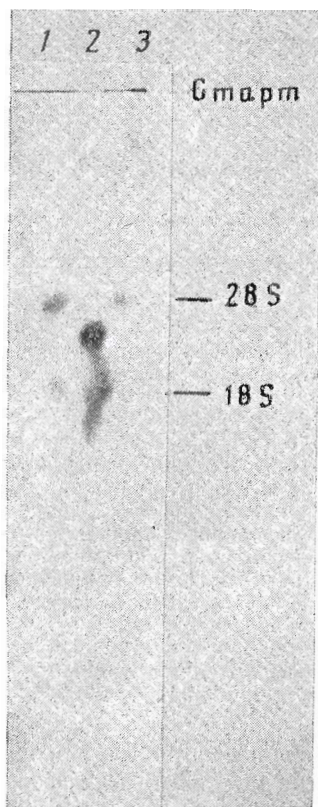


Рис. 1. Нозерн-блот-анализ poly(A⁺)-мРНК из печени крысы: 1, 3 — тотальная РНК, 10 мкг; 2 — poly(A⁺)-РНК, 4 мкг

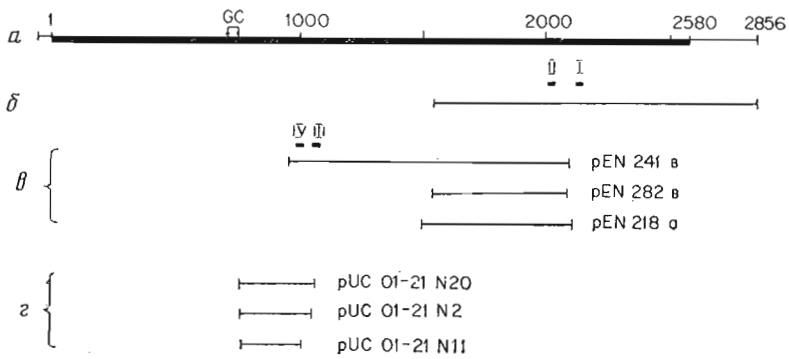


Рис. 2. Схема клонированных кДНК EF-2: *a* — полноразмерная кДНК EF-2 из клеток китайского хомячка (из работы [1]). Жирной линией выделена кодирующая часть, стрелками обозначен GC-богатый район; *б* — кДНК EF-2 из печени крысы, полученная Коно с сотр. [1]. I и II — участки, соответствующие олигонуклеотидам (I) и (II), комплементарным мРНК EF-2; *в* — кДНК EF-2 из клонов серии pEN, полученных в данной работе. III и IV — участки, соответствующие олигонуклеотидам (III) и (IV), комплементарным мРНК EF-2; *г* — кДНК EF-2 из клонов серии pUC01-21, полученных в данной работе. Изображены кДНК трех клонов из 40 исследованных

до нескольких десятков нуклеотидов, что отражает как обрыв первой цепи в определенном месте, так и потерю оснований при синтезе второй цепи кДНК. Таким образом, очевидно, что синтез первой цепи кДНК прерывался примерно в одном и том же месте (см. рис. 2*г*) и вероятность этого процесса составляла не менее 97,5% (кДНК из 40 клонов обрывается до определенного места).

Анализ гомологичной последовательности кДНК EF-2 хомячка [1] в направлении к 5'-концу мРНК от места прерывания синтеза первой цепи кДНК EF-2 крысы показал, что здесь расположен GC-богатый участок последовательности: 27 оснований G и C из 34 (основания N 750 — N 716 в работе [1]) (рис. 2*а*). Заметим, что в мРНК EF-2 крысы число G и C оснований на этом участке может быть больше даже без изменения кодируемой последовательности. Таким образом, видимо, именно этот GC-богатый район мРНК EF-2 крысы является сильным стоп-сигналом для обратной транскриптазы и синтез кДНК дальше по направлению к 5'-концу мРНК представляет в этом случае серьезную проблему. Тем более проблематично клонирование 5'-концевой области этой мРНК при синтезе кДНК с помощью oligo(dT)-затравки. Природа этого стоп-сигнала в настоящее время неясна. Однако представляется возможным использование этой системы для изучения подобного рода стоп-сигналов для обратной транскриптазы и способов их преодоления.

Сравнение первичной структуры кДНК EF-2 крысы, полученной в данной работе (рис. 3), со структурами кДНК EF-2 хомячка и крысы, представленными в работе Коно с сотр. [1], показывает: 1) полное совпадение нуклеотидных последовательностей между перекрывающимися частями кДНК EF-2 крысы, приведенными в нашей работе и работе [1]; 2) большую гомологию (89%) с нуклеотидной последовательностью хомячка; 3) единственное различие в аминокислотных последовательностях EF-2 крысы и хомячка — остаток Glu-441 у хомячка меняется на остаток Asp у крысы (рис. 3). Почти все различия в нуклеотидных последовательностях локализируются в третьем положении кодонов.

Суммирование результатов этой работы с результатами по первичной структуре кДНК EF-2 крысы из работы Коно с сотр. [1] дает первичную структуру участка кДНК EF-2 крысы длиной 2094 оснований, начиная от 3'-конца мРНК, (603 аминокислотных остатка от С-конца белка из 858). В настоящее время предпринимаются попытки получения клона кДНК EF-2, крысы, соответствующего оставшейся непроанализированной 5'-концевой области мРНК.

Использованная стратегия синтеза кДНК с помощью специфической затравки может быть применена и для быстрого клонирования 3'-концевой части мРНК, если специфический олигонуклеотид использовать как

(766) 4 ATG ATG AAG AAG T CTG TGG GGA GAC T CGG TAT TTT GAC T CCG GCC AAC T GGC AAG A TTC AGC AAG
256 Met Met Lys Lys Leu Trp Gly Asp Arg Tyr Phe Asp Pro Ala Asn Gly Lys Phe Ser Lys

(826) C T C T T G A T C
64 TCA GCC AAT AGC CCA GAC GGG AAG AAA CTT CCC CGC ACC TTC TGC CAG CTC ATC TTG GAC
276 Ser Ala Asn Ser Pro Asp Gly Lys Lys Leu Pro Arg Thr Phe Cys Gln Leu Ile Leu Asp

(886) C A G
124 CCC ATC TTC AAG GTG TTT GAT GCC ATC ATG AAC TTC AGG AAG GAG GAG ACA GGC AAG CTG
296 Pro Ile Phe Lys Val Phe Asp Ala Ile Met Asn Phe Arg Lys Glu Glu Thr Ala Lys Leu

(946) T # T C A G C
184 ATC GAG AAG CTG GAC ATC AAG CTG GAC AGT GAG GAC AAG GAC AAG GAG GGC AAA CCA CTG
316 Ile Glu Lys Leu Asp Ile Lys Leu Asp Ser Glu Asp Lys Asp Lys Glu Gly Lys Pro Leu

(1006) C G C A G + A
244 CTG AAG GCT GTG ATG CGT CGC TGG CTG CCT GCT GGT GAC GCC CTG CTA GAG CATG ATG ATC ACC
336 Leu Lys Ala Val Met Arg Arg Trp Leu Pro Ala Gly Asp Ala Leu Leu Gln Met Ile Thr

(1066) C C T C C C A C C C C G
304 ATC CAC TTG CCG TCC CCG GTC ACT GCA CAG AAG TAC CGT TGT GAG CTG CTG TAC GAG GGC
356 Ile His Leu Pro Ser Pro Val Thr Ala Gln Lys Tyr Cys Glu Leu Leu Tyr Glu Tyr Glu

(1126) T G C A T T G T T G T T
364 CCA CCT GAT GAC GAG GCC GCC ATG GGT ATT AAG AGC TGC GAC CCC AAA GGC CCC CTA ATG
376 Pro Pro Asp Asp Glu Ala Ala Met Gly Ile Lys Ser Cys Asp Pro Lys Gly Pro Leu Met

(1186) T C C C T T C T
424 ATG TAC ATC TCC AAG ATG GTG CCA ACA TCT TCT GAC AAA GGC CGC TTC C GGC TTC GGT AGA
396 Met Tyr Ile Ser Lys Met Val Pro Thr Ser Asp Lys Gly Arg Phe Tyr Ala Phe Gly Arg

(1246) C A G A C C C G
484 GTG TTC TCT GGG GTG GTG TCC ACA GGT CTG AAG GTC CCG ATC ATG GGC CCC AAC TAT ACA
416 Val Phe Ser Gly Val Ser Thr Gly Leu Lys Val Arg Ile Met Gly Pro Asn Tyr Thr

(1306) *** C A C
544 CCT GGG AAG AAG GAG GAC CTG TAC CTG AAG CCT ATC CAG AAG ACC ATT CTG ATG ATG GGC
436 Pro Gly Lys Lys Glu Asp Leu Tyr Leu Lys Pro Ile Gln Arg Thr Ile Leu Met Met Gly

(1366) G A C T T A
604 CGC TAT GTG GAA CCC ATT GAG GAT GTG CCC TGT GGC AAC ATT C GGC C T T A
456 Arg Tyr Val Glu Pro Ile Glu Asp Val Pro Cys Gly Asn Ile Val Val Val Gly Val Gly Val

(1426) T G A G T C A A T T
664 GAC CAG TTC CTT GTG AAG ACC GGC ACC ATC ACT ACC TTT GAG CAC GCT CAC AAC ATG CCG
476 Asp Gln Phe Leu Val Lys Thr Gly Thr Ile Thr Thr Phe Glu His Ala His Asn Met Arg

(1486) C A T T A T
724 GTG ATG AAG TTC AGC GTC AGC CCT GTA GTC AGG GTG GCA TGT GAG GGC AAG AAC CCA GCT
496 Val Met Lys Phe Ser Val Ser Pro Val Val Arg Val Ala Val Glu Ala Lys Asn Pro Ala

(1546) A C A A
784 GAC CTG CCC AAG CTG GTG GAG GGG CTG AAG CGG CTG GCT AAG TCT GAC CCT ATG GTG CAG
516 Asp Leu Pro Lys Leu Val Glu Gly Leu Lys Arg Leu Ala Lys Ser Asp Pro Met Val Gln

(1606) T A A T A
844 TGC ATC ATC GAG GAG TCT GGG GAG CAC ATC ATT GCT GGT GCT GGA GAG CTG CAC CTG GAG
536 Cys Ile Ile Glu Glu Ser Gly Glu His Ile Ile Ala Gly Ala Gly Glu Leu His Leu Glu

(1666) C C C A
904 ATC TGC CTT AAG GAC CTG GAG GAG GAC CAT GCC TGC ATC CCC ATC AAG AAA TCT GAC CCT
556 Ile Cys Leu Lys Asp Leu Glu Glu Asp His Ala Cys Ile Pro Ile Lys Lys Ser Asp Pro

(1726) T C A G C A T G C G
964 GTC GTG TCC TAC CGG GAG ACA GTC AGT GAG GAG TCC AAC GTG CTC TGT CTT TCC AAG TCC
576 Val Val Ser Tyr Arg Glu Thr Val Ser Glu Glu Ser Asn Val Leu Cys Leu Ser Lys Ser

(1786) C C A T T C G C
1024 CCA AAC AAG CAC AAC AGG CTG TAC ATG AAG GCC AGG CCC TTC CCT GAT GGC CTA GCA GAG
596 Pro Asn Lys His Asn Arg Leu Tyr Met Lys Ala Arg Pro Phe Pro Asp Gly Leu Ala Glu

(1846) C A G T A C A C T A
1084 GAC ATC GAT AAG GGT GAG GTA TCT GCC CGC CAG GAG CTC AAG GCG CGT GCC CGT TAC CTG
616 Asp Ile Asp Lys Gly Glu Val Ser Ala Arg Gln Glu Leu Lys Ala Arg Ala Arg Tyr Leu

(1906) T C A G
1144 GCC GAA AAG TAT GAG TGG GAT GTT GCT GAA GCC CGC AAG ATC TGG TGC TTT GGA GCT GAT
636 Ala Glu Lys Tyr Glu Trp Asp Val Ala Glu Ala Arg Lys Ile Trp Cys Phe Gly Pro Asp

(1966) C T T (2014)
1204 GGC ACT GGT CCC AAC ATT CTC ACC GAC ATC ACC AAG GGT GTG CAG TAC 1251
656 Gly Thr Gly Pro Asn Ile Leu Thr Asp Ile Thr Lys Gly Val Gln Tyr 672

затравку для синтеза второй цепи кДНК после получения первой цепи с помощью oligo(dT)-затравки. С развитием методов определения первичной структуры белков с С-конца синтез специфической кДНК может стать наиболее удобным методом для быстрого клонирования ДНК, комплементарной всей кодирующей части интересующей мРНК.

Экспериментальная часть

В работе использовали трис, спермин·4HCl, oligo(dT)-целлюлозу, β-меркаптоэтанол, мочевины (Sigma, США); EDTA, додецилсульфат натрия (SDS), бычий сывороточный альбумин (BSA), глиоксаль (Serva, ФРГ), фиколл (M_r 400 000), поливинилпирролидон (M_r 360 000) (Fluka, Швейцария), ацетат натрия (Merck, ФРГ), фильтры Whatman 541 (Whatman, Англия), дезоксинуклеозидтрифосфаты (Pharmacia, Швеция), нейлоновые фильтры ZETA-probe (Bio-Rad, США), эндонуклеазы рестрикции, 5'-End Labelling Kit (Boehringer Mannheim, ФРГ), [^3H]dCTP (32 Ки/ммоль), рибонуклеазный ингибитор РНКазин, ДНК-полимеразу I *E.coli*, рибонуклеазу H, T4-ДНК-полимеразу, T4-ДНК-лигазу, M13 Cloning Kit, M13 Sequencing Kit, M13 — обратный праймер для секвенирования, терминальную дезоксинуклеотидилтрансферазу (Amersham, Англия), обратную транскриптазу из вируса миелобластома птиц (СССР). Остальные реактивы отечественного производства квалификации ос. ч.

Синтез олигонуклеотидов. Олигодезоксинуклеотиды синтезировали на ДНК-синтезаторах фирм Pharmacia, модель Gene Assembler (oligo-II и oligo-III) и Beckman, модель System 1 (oligo-I и oligo-IV). После синтеза и деблокирования олигонуклеотиды очищали электрофорезом в 20% ПААГ с 7 М мочевиной, экстрагировали из геля TE-буфером (10 мМ трис-HCl (pH 7,5), 1 мМ EDTA) и очищали на колонках Nensorb 20 (Du Pont, США) согласно рекомендациям фирмы-производителя. Были синтезированы следующие олигонуклеотиды: dTGGATGGCATCAGCATGCAGGGGTCTC (oligo-I), dTCCTTGATCTCATTCAG (oligo-II), dGATCATCTGTAGCAGG-GCGTC (oligo-III), dCCCTCCTTGTCTTGTCC (oligo-IV).

Синтез специфической кДНК и получение библиотеки кДНК. РНК из печени крысы выделяли методом фенольной депротеинизации [9]. Фракцию poly(A⁺)-мРНК получали по методу [10]. Синтез первой цепи кДНК проводили в объеме 50 мкл с 10 мкг poly(A⁺)-мРНК по методу [11] с небольшими изменениями. Реакционная смесь содержала 100 мМ трис-HCl (pH 8,3), 10 мМ MgCl₂, 140 мМ KCl, 4 мМ пиррофосфат натрия, 1 мМ каждый из четырех dNTP, 10 мкКи, [^3H]dCTP, 30 мМ β-меркаптоэтанол, 25 ед. акт. РНКазина, 0,5—1,0 мкг олигонуклеотидной затравки (oligo-I или oligo-III), 50 ед. акт. обратной транскриптазы. Перед добавлением фермента проводили быстрый отжиг праймера с матрицей. Для этого прогревали poly(A⁺)-мРНК 5 мин при 65° С и олигонуклеотидную затравку 3 мин при 90° С и добавляли в предварительно подогретую до 42° С реакционную смесь. Инкубировали 10 мин при 42° С, затем 15 мин при 0° С, добавляли обратную транскриптазу и проводили реакцию 40 мин при 42° С. Вторую цепь кДНК синтезировали с помощью ДНК-полимеразы I и РНКазы H по методу [11]. Для получения тупых концов кДНК обрабатывали затем T4-ДНК-полимеразой [6]. После реакции фермент инактивировали нагреванием до 70° С в течение 10 мин и двухцепочечную кДНК (дц кДНК) осаждали дважды спермином [12] для удаления белка, dNTP и мелких (<100 п. о.) фрагментов кДНК. Дц кДНК встраивали либо в плазмиду pBR322 по сайту PstI конфекторным методом [6] (гибридные плазмиды серии pEN), либо в плазмиду pUG8 по сайту SmaI лигированием

Рис. 3. Первичная структура кДНК EF-2 из печени крысы, определенная в настоящей работе. Основания, изображенные над нуклеотидной последовательностью кДНК EF-2 крысы, обозначают отклонения от последовательности нуклеотидов кДНК EF-2 хомячка (по данным работы [1]). # — 5'-конец кДНК pEN 241b, + — 3'-конец кДНК pUC01-21. **А — аминокислотная замена в EF-2 крысы по сравнению с EF-2 хомячка. Номера аминокислотных остатков и номера нуклеотидов в скобках даны в соответствии с работой [1]

по тупым концам (гибридные плазмиды серии рUC01-21). Лигирование проводили в объеме 10 мкл с 2,5 ед. акт. T4-ДНК-лигазы, 50 нг дефосфорилированного вектора и 3 нг дц кДНК [6]. После трансформации компетентных клеток *E. coli* MC1061 в обоих случаях получали около 1000—2000 клонов на 1 нг кДНК. Фон от негибридных клонов составлял 10—15%.

Поиск клонов кДНК EF-2. Поиск клонов кДНК EF-2 проводили после переноса гибридных клонов на фильтры Whatman 541 гибридизацией с 5'-³²P-меченым олигонуклеотидом II или IV по методу [13] при соответствующих расчетных температурах [14]. Фильтры отмывали от неспецифически связанного зонда в 6 × SSC-буфере (20 × SSC = 3,0 М NaCl, 300 мМ цитрат натрия) 3 раза по 30 мин при комнатной температуре и 2 раза по 15 мин при температурах гибридизации [14].

Определение первичной структуры кДНК проводили методом Сенгера [7] в двух модификациях. В первом случае секвенировали дц кДНК [8], используя в качестве праймеров олигонуклеотиды II, IV или стандартные прямой и обратный M13-праймеры (при секвенировании плазмид серии рUC01-21). Во втором случае переклонировали фрагменты кДНК, полученные после рестрикции подходящими рестриктазами, в фаз M13, используя Amersham M13 Cloning Kit. После этого секвенировали одноцепочечную ДНК с помощью Amersham Sequencing Kit.

Норзерн-блот-анализ poly (A⁺)-мРНК из печени крысы. poly(A⁺)-мРНК подвергали электрофорезу в 1% агарозном геле с глиоксалем [6] и переносили на нейлоновые фильтры ZETA-probe электроблоттингом согласно рекомендациям фирмы Bio-Rad. Предгибридизацию проводили в растворе 6 × SSC, 50 мМ натрий-фосфат (рН 7,0), 0,2% фиколл, 0,2% поливинилпирролидон, 0,2% BSA, 1 мг/мл тРНК *E. coli* при 55° С в течение 8 ч. Гибридизацию осуществляли в таком же растворе с добавлением ³²P-меченого oligo-I (10⁶ имп/(мин·мл)) при 55° С в течение ночи. Фильтр отмывали в 6 × SSC, 0,1% SDS 3 раза по 30 мин при комнатной температуре и 2 раза по 15 мин при 55° С.

Авторы благодарны В. Н. Добрынину (ИБХ АН СССР), А. Т. Гудкову и О. И. Грязновой (ИБ АН СССР) за синтез олигонуклеотидов, Н. В. Храмову (ИБХ АН СССР) за препарат дефосфорилированной плазмиды рUC8, расщепленной по *Sma*I-сайту, а также Л. П. Мотуз и В. Б. Миниху (ИБ АН СССР) за критические замечания, высказанные при прочтении рукописи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kohno K., Uchida T., Ohkubo H., Nakanishi S., Nakanishi T., Fukui T., Ohtsuka E., Ikehara M., Okada Y. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1986. V. 83. № 14. P. 4978—4982.
2. Rapp G., Mucha I., Einspanier R., Luck M., Scheit K. H. // Biol. Chem. Hoppe-Seyler. 1988. V. 369. № 14. P. 247—250.
3. Noda M., Furutani Y., Takahashi H., Toyosato M., Hirose T., Fnayama S., Nakanishi S., Numa S. // Nature. 1982. V. 295. № 5846. P. 202—206.
4. Nishimura Y., Rosenfeld M. G., Kreibich G., Gubler U., Sabatini D. D., Adesnik M., Andy R. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1986. V. 83. № 19. P. 7292—7296.
5. Олейников А. В., Высоцкий В. С., Алахов Ю. Б. // Тез. VII Всесоюз. симпоз. по химии белков и пептидов. Таллинн, 1987. М.: Изд. Ин-та биоорган. химии АН СССР. С. 85—86.
6. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. С. 232—238.
7. Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1977. V. 74. № 12. P. 5463—5467.
8. Hattori M., Sakaki Y. // Anal. Biochem. 1986. V. 152. № 2. P. 232—238.
9. Shore G. C., Tata J. R. // J. Cell Biol. 1977. V. 72. № 2. P. 726—735.
10. Aviv H., Leder P. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1972. V. 69. № 6. P. 1408—1412.
11. Gubler U., Hoffman B. J. // Gene. 1983. V. 25. № 2/3. P. 263—269.
12. Hoopes B. C., McClure W. R. // Nucl. Acids. Res. 1981. V. 9. № 20. P. 5493—5504.
13. Gergen J. P., Stern R. H., Wensink P. C. // Nucl. Acids. Res. 1979. V. 7. № 8. P. 2115—2136.
14. Meinkoth J., Wahl G. // Anal. Biochem. 1984. V. 138. № 2. P. 267—284.

Поступила в редакцию

5. XI.1988

После доработки

28.III.1989

CLONING AND SEQUENCING OF THE PRIMARY STRUCTURE
OF cDNA CODING FOR THE CENTRAL PART OF THE RAT LIVER
ELONGATION FACTOR 2

OLEINIKOV A. V., JOKHADZE G. G.*, ALAKHOV Yu. B.

*Institute of Protein Research, Academy of Sciences of the USSR,
Pushchino Moscow Region;*

**Institute of Molecular Biology and Biological Physics, Academy of
Sciences of Georgian SSR, Tbilisi*

A number of cDNA clones coding for 417 amino acid residues of the central part of the rat liver elongation factor 2 (EF-2) have been isolated. The oligonucleotides complementary to EF-2 mRNA were used as primers for synthesis of the first strand of cDNA cloned. Structures of these oligonucleotides were determined in course of 3' → 5' sequencing coding strand of EF-2 cDNA. This method of synthesis of specific cDNA enabled one to reduce essentially the number of recombinant clones to be screened for EF-2 cDNA. Comparative studies of deduced protein sequences of rat liver EF-2 and hamster EF-2 [1] revealed the only substitution of aspartate residue for glutamate residue (hamster EF-2). The homology between nucleotide sequences of rat and hamster EF-2 cDNA was 89%. Northern-blot analysis of rat liver poly(A)⁺ mRNA revealed the only species of mRNA 3000 nucleotides long. A strong stop-signal for reverse transcriptase in the 5'-region of rat liver EF-2 mRNA is discovered: probability of dissociation of the enzyme from mRNA is at least 97,5%.