



УДК 577.113.5

ФОТОСИСТЕМА II РЖИ. НУКЛЕОТИДНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ГЕНОВ *psbE*, *psbF*, *psbL* И *ORC40* ХЛОРОПЛАСТНОЙ ДНК

Колосов В. Л., Елезович О. Н., Абдулаев Н. Г.,
Золотарев А. С.

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

Одним из белков, входящих в реакционный центр фотосистемы II (ФС II) растений, является мембранный белок цитохром b_{559} [1]. Роль этого белка в функционировании ФС II в настоящее время неясна [2, 3]. Полипептиды, входящие в состав цитохрома b_{559} , кодируются двумя генами (*psbE*, *psbF*), локализованными друг за другом в большом однокопийном районе хлоропластной ДНК. Известна нуклеотидная последовательность 10 генов *psbE* и *psbF* ряда фотосинтезирующих организмов [4], среди которых единственный вид однодольных — пшеница [5]. Гены имеют

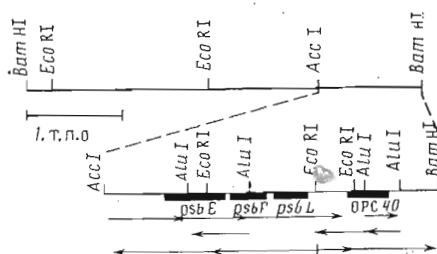


Рис. 1. Рестриктивная карта фрагмента В12 хлоропластной ДНК ржи. Гены (показаны темными прямоугольниками) транскрибируются слева направо. Стрелками указано направление и протяженность спикнсов.

ярко выраженный прокариотический характер, исключение составляет *Euglena gracilis* [4], гены которой содержат интроны.

В ходе изучения структуры генов хлоропластной ДНК ржи, кодирующих белки ФС II, нами установлена нуклеотидная последовательность генов *psbE*, *psbF* и котранскрибируемых совместно с ними открытых рамок считывания (ОРС)—ОРС38 и ОРС40 [6]. Недавно продукт экспрессии ОРС38 обнаружен в составе частиц ФС II, лишенных светособирающего комплекса. Эту рамку считывания было предложено обозначить как ген *psbL* [7]. Следует отметить, что в литературе существуют разночтения в обозначении этих рамок считывания [4].

Для получения искомым генов использовали ^{32}P -меченый синтетический олигонуклеотидный зонд d(GACGTGTTTGGAAGTCCTAG GCCAAACGAG), соответствующий центральной части гена *psbE* пшеницы, структура которого была установлена ранее [5]. Зонд синтезировали фосфоамидитным методом на синтезаторе фирмы Applied Biosystems (США). Хлоропластную ДНК ржи выделяли как в работе [8]. Гидролиз вели эндонуклеазой рестрикции *Bam*HI (НПО «Фермент», Вильнюс) и полученные фрагменты разделяли в 0,6% легкоплавком агарозном геле. Гибридуемый с зондом фрагмент В12 размером 4,2 т. п. о. выделяли из агарозного геля и лигировали в *Bam*HI-сайт полилинкера плазмиды pTZ19R (Pharmacia, Швеция) [9]. Трансформанты *E. coli* (штамм МН1), несущие плазмиду со вставкой В12, отбирали с помощью вышеупомянутого олигонуклеотидного зонда.

На рис. 1 приведена рестриктивная карта клонированного нами *Bam*HI фрагмента ДНК ржи и стратегия определения нуклеотидной последовательности участка *Acc*I-*Bam*HI дидезоксинуклеотидным методом [10]

```

1 GTATACTCAAAAATACACCTTTTGGTACAAAATTGACAATCTCACAAGGAATGAAAATATCAGTAATTTCTATT
  T G G C T G A - T G A GTC
                                          psbE►
                                          Met
73 TACTGGTTCGATCCCATCTTTTACGGAATCAATTCCTTTTTTGAATGTACAAAAATTTGGGAGTTCAGCATG
  T G C C G A GT C
SerGlySerThrGlyGluArgSerPheAlaAspIleIleThrSerIleArgTyrTrpValIleHisSerIle
145 TCTGGAAGCACGGGAGAACGTTCTTTTGCTGATATATTACCAGTATTTCGATACTGGGTTATTTCATAGCATT
  A G C C
ThrIleLeuSerLeuPheIleAlaGlyTrpLeuPheValSerThrGlyLeuAlaTyrAspValPheGlySer
217 ACTATACCTTCCTATTCATTCGCGGGTGGTTATTGTCTCAGTACGGGTTTAGCTTATGACGTGTTTGGAACT
  C C C T C
ProArgProAsnGluTyrPheThrGluSerArgGlnGlyIleProLeuIleThrAspArgPheAspSerLeu
289 CCTAGGCCAAAACGAGTATTTTCACGGAAGCCGACAAGGAATTCCTTAATAACCGACCGTTTGTGATCTTTTA
  C T A G A T G C G
                                          psbF►
                                          MetThrIleAspArgThrTyrProIlePhe
361 GAACAACCTCGATGAATTTAGTAGATCCTTTTAGGAGGCCCTCAATGACCATAGATCGAACCTATCCTATTTT
  G T A
ThrValArgTrpLeuAlaIleHisGlyLeuAlaValProThrValPhePheLeuGlySerIleSerAlaMet
433 TACAGTGGGATGGCTGGCTATTTCACGGACTAGCTGTACCTACTGTTTTTTCTCTGGGATCAATATCAGCAAT
  A T G C C C T
                                          psbL►
                                          MetThrGlnSerAsnProAsnGluGlnAsn
505 GCAGTTCATCCAACGATAAAACCAAAATCCAACTATAGAAGTATGACACAATCAAACCCGAAATGAACAAAATG
  TT CG T G C C
ValGluLeuAsnArgThrSerLeuTyrTrpGlyLeuLeuLeuIlePheValLeuAlaValLeuPheSerAsn
577 TTGAATTGAATCGTACCAGTCTATACTGGGGTTTATTACTCATTTTTGTACTTGTCTGTTTTATTTCCAAAT
  C G
TyrPhePheAsn***
649 ACTTCTTCAATTGAGAGAAAAGAGACTAATAAGAATTCTCTTATCCCATTGGAAGGATACCATCCTTA
  T A A C A C AT AG G T C CT AA -
                                          OPC40►
                                          MetAla
721 TAACTACCCATGACTGTTTTTGTCTCTAGCATGACCAATTGATAAAATGTGGAGGAAAGTAGGGGAAATGGC
  T T A C C A T G A T A A A T G T G G A G G A A A G T A G G G G A A A T G G C
AspThrThrGlyArgIleProLeuTrpLeuIleGlyThrValAlaGlyIleAlaValIleGlyLeuValGly
793 CGATACTACTGGAAGAATTCTCTTTGGCTGATAGGTACTGTAGCTGGTATTGCTGTGATTGGTTTAGTAGG
  G A A CT A C A
ValPhePheTyrGlySerTyrSerGlyLeuGlySerSerLeu***
865 TGTTTTCTTTTATGGTTTCATATCTGGATGGGTTCATCTCTATAGTAATCGGAGGGACCAGATTGTTAAAC
  A C C C A T A
937 ATGAAAAAGTAGGAGCTTAGCGGTCTTACCCCCCTTTATCTGATTAGAGCGGAAAAGGACCCCGCGGAATTTT
1009 TACTCTTATAACCGCAATTGAATCTATTTCGATTCACTCTTATGAAGCAACAAGAAAAGAGATCACTCGAGG
1081 ATCC

```

Рис. 2. Нуклеотидная последовательность фрагмента ДНК ржи, содержащего кластер генов *psbE*, *psbF*, *psbL* и *OPC40*. Сверху нуклеотидной последовательности кодирующей цепи показаны соответствующие ей последовательности аминокислот, снизу — нуклеотидные замены в соответствующем фрагменте хлоропластной ДНК табака (сравнение приведено с 1-го по 921-й н. о., дефисами обозначены deletированные нуклеотиды). Подчеркнуты предполагаемые рибосомсвязывающие сайты, а также —35- и —10-участки промотора. Стрелками в 3'-концевом районе нуклеотидной последовательности обозначен инвертированный повтор

с модификациями [11]. Переклонирование фрагментов ДНК в фаговые векторы M13mp18, M13mp19 и наработку однонитевой матрицы осуществляли как описано ранее [8].

Из полученных нами данных следует, что гены *psbE*, *psbF*, *psbL* и *OPC40* расположены внутри *AccI—Bam*HI-фрагмента ДНК длиной 1084 п. о. (рис. 2).

Сравнение секвенированных генов ржи и табака выявляет различную степень гомологии. Так, у генов *psbE* и *psbF* цитохрома *b₅₅₉* ржи по сравнению с соответствующими генами табака изменено 27 из 366 п. о. (93% гомологии). Продукты их трансляции гомологичны на 98%. Гомология между генами *psbL* выше (96%) и продукты трансляции идентичны.

Наименее консервативна ОРС40 (90% гомологии). Нетранслируемый район (141 п. о.) левее кластера генов *psbE-psbF-psbL*-ОРС40 гомологичен на 79%. Правее кластера гомология резко обрывается через 10 п. о. за стоп-кодоном ОРС40.

Опубликованная структура фрагмента пшеницы (554 п. о.) включает в себя гены *psbE*, *psbF* и часть гена *psbL* [5]. Ее гомология с нуклеотидной последовательностью ржи почти 100% (один нуклеотид вставлен и один заменен), при этом структуры генов *psbE* и *psbF* идентичны.

Авторы выражают благодарность Н. С. Быстрову за синтез олигонуклеотидного зонда.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Namba O., Satoh K. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1987. V. 84. № 1. P. 109—112.
2. Cramer W. A., Theg S. M., Widger W. R. // Photosynth. Res. 1986. V. 10. № 4. P. 393—403.
3. Pakrasi H. B., Williams J. G. K., Arntzen C. J. // EMBO J. 1988. V. 7. № 2. P. 325—332.
4. Cushman J. C., Christopher D. A., Little M. C., Hallick R. B., Price C. A. // Curr. Genet. 1988. V. 13. № 2. P. 173—180.
5. Hird S. M., Willey D. L., Dyer T. A., Grey J. C. // Mol. Gen. Genet. 1986. V. 203. № 2. P. 95—100.
6. Westhoff P., Alt J., Widger W. R., Cramer W. A., Herrmann R. G. // Plant. Mol. Biol. 1985. V. 4. N 2/3. P. 103—110.
7. Ikeuchi M., Takio K., Inoue Y. // FEBS Lett. 1989. V. 242. № 2. P. 263—269.
8. Бухаров А. А., Колосов В. Л., Золотарев А. С., Абдулаев Н. Г. // Биооргани. химия. 1989. Т. 15. № 7. С. 927—939.
9. Мануатис Т., Фриш Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии: молекулярное клонирование. М.: Мир. 1984.
10. Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1977. V. 74. № 12. P. 5463—5467.
11. McGraw III R. A. // Anal. Biochem. 1984. V. 143. № 2. P. 298—303.

Поступило в редакцию
17.III.1989

NUCLEOTIDE SEQUENCES OF THE RYE CHLOROPLAST *psbE*, *psbF* AND *psbL* GENES CODING FOR THE POLYPEPTIDES OF PHOTOSYSTEM II

KOLOSOV V. L., KLEZOVICH O. N., ABDULAEV N. G., ZOLOTAREV A. S.

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

The primary structure of the 1084 bp *AccI*—*Bam*HI fragment of rye chloroplast DNA containing *psbE*, *psbF* and *psbL* genes and ORF40 with their flanking and intergenic regions is elucidated.

Технический редактор Н. Н. Беллеса

Сдано в набор 20.06.89 Подписано к печати 03.08.89 Т-13806 Формат бумаги 70×108^{1/16}
Высокая печать Усл. печ. л. 12,6 Усл. кр.-отт. 11,6 тыс. Уч.-изд. л. 14,6 Бум. л. 4,5
Тираж 900 экз. Зак. 3121 Цена 1 р. 80 к.

Адрес редакции: 117990, ГСП-1, ул. Вавилова, 31, комн. 335 Телефон: 135-97-27
2-я типография издательства «Наука», 121099, Москва, Г-99, Шубинский пер., 6