



УДК 577.113.5

© 1990 г.

В. Л. Колосов, А. С. Золотарев

ФОТОСИСТЕМА II РЖИ. КЛОНИРОВАНИЕ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ
НУКЛЕОТИДНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ФРАГМЕНТОВ
ХЛОРОПЛАСТНОЙ ДНК, ВКЛЮЧАЮЩИХ В СЕБЯ ПОЛНО-
РАЗМЕРНЫЙ
ГЕН *psbA*, КОДИРУЮЩИЙ БЕЛОК D1

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР, Москва

Клонированы *EcoRI*- и *BamHI*-фрагменты хлоропластной ДНК ржи, включающие в себя ген *psbA*, и определена нуклеотидная последовательность участка ДНК длиной 2729 п. о. Показано, что при клонировании *EcoRI*-фрагмента в плазмиде pTZ19R происходит делеция одного нуклеотида в кодирующей области гена *psbA*. Подобраны условия клонирования полноразмерного гена *psbA*, позволяющие избежать летального воздействия на клетку хозяина продукта экспрессии этого гена. На основании полученных результатов обсуждается различие в организации расположенных за геном *psbA* участков хлоропластной ДНК одно- и двудольных растений. Установлено, что на расстоянии 131 п. о. от стоп-кодона гена *psbA* на противоположной цепи ДНК расположена последовательность гена *rps19*. Приведен сравнительный анализ аминокислотных последовательностей белков D1 и S19 различных видов растений.

В состав реакционного центра (РЦ) фотосистемы II (ФС II) входит мембранный белок с кажущейся молекулярной массой 32 кДа [1, 2], обычно обозначаемый D1 [3] или Q_v [4]. Этот белок образует карман (Q_v) для связывания вторичного акцептора электронов — пластохинона и является мишенью действия гербицидов триазинового ряда и фенилмочевин [5]. На цианобактериях методом направленного мутагенеза показано, что остаток Tyr^{161} белка D1 выполняет функцию окислительно-восстановительного центра Z, участвующего в переносе электронов от кислородвыделяющего комплекса на фотоокисленный $P680^+$ [6, 7].

До сборки в РЦ ФС II предшественник белка D1 претерпевает протеолитический процессинг [8, 9]. От него отщепляется 9-членный C-концевой фрагмент [10] и N-концевой аминокислотный остаток формилметионина [11]. Первый аминокислотный остаток зрелого полипептида (треонин) ацетируется по аминогруппе и фосфорилируется по гидроксигруппе [11, 12]. Мембраносвязанный предшественник процессируется на ламеллах стромы с последующей транслокацией в область стыкованных ламелл гран, подвергаясь при этом пальмитилированию [13].

Уровень экспрессии белка D1 контролируется светом. В этиолированных проростках белок отсутствует, но его концентрация резко возрастает после их освещения [14]. В темноте (*in vivo*) белок достаточно стабилен [15], но быстро разрушается под воздействием света. Уровень белка D1 на свету, необходимый для оптимального функционирования ФС II, поддерживается за счет ускоренного образования вновь синтезированных молекул, т. е. скорость деградации и синтеза белка D1 пропорциональна интенсивности освещения [5, 15] и значительно превосходит таковую для других тилакоидных белков [13, 16].

Ген *psbA*, кодирующий белок D1, расположен, как правило, в виде

Сокращения: ФС II — фотосистема II, РЦ — реакционный центр, хлДНК — хлоропластная ДНК, ОРС — открытая рамка считывания.

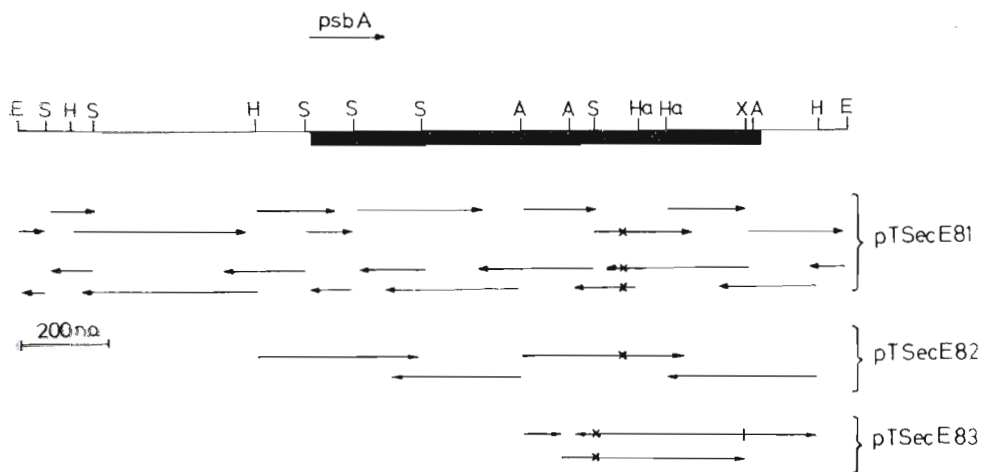


Рис. 1. Рестриктивная карта фрагмента E8 хлДНК ржи длиной 1937 п.о. и стратегия секвенирования трех плазмид. Крестиками отмечены места однонуклеотидных делеций. А — *AluI*, Е — *EcoRI*, Н — *HincII*, Ha — *HaeIII*, S — *Sau3A*, X — *XbaI*

единичной копии преимущественно в концевом участке большого однокопийного района хлоропластной ДНК (хлДНК) высших растений. Все изученные нуклеотидные последовательности гена *psbA* кодируют треонин во второй позиции белка D1, за исключением гена *psbA Euglena gracilis*, у которой отсутствует также нуклеотидная последовательность, кодирующая девять С-концевых аминокислот [17]. Ген *psbA* относится к классу так называемых фотогенов [18]. Предполагается, что его экспрессия регулируется как на уровне транскрипции [5, 15], так и на уровне трансляции [14, 19, 20]. Ген транскрибируется в мРНК размером 1,2 т. о., которая является одной из наиболее представленных в пуле мРНК хлоропластов [21, 22]. мРНК белка D1 локализована как на растворимых, так и на мембраносвязанных рибосомах [23, 24].

Несмотря на трудности при клонировании фрагментов ДНК, содержащих ген *psbA* [25—28], его структура определена для ряда цианобактерий и многих видов растений [5, 28—30], в том числе злаков: ячменя [27, 31], ржи [32], пшеницы [33] и риса [22, 34]. В ходе установления нуклеотидной последовательности гена *psbA* ржи [32] нами первоначально были получены рекомбинантные плазмиды, несущие однонуклеотидные делеции в области гена.

В настоящей работе подобраны условия клонирования полноразмерного гена *psbA*, позволяющие избежать его летального воздействия на клетку хозяина. Установлена нуклеотидная последовательность участка хлДНК ржи длиной 2729 п. о.

Гидролиз хлДНК вели эндонуклеазами рестрикции *BamHI* и *EcoRI*. Фрагменты, содержащие ген *psbA*, — *EcoRI*-фрагмент размером 1,93 т. п. о. (E8) и *BamHI*-фрагмент размером 5,1 т. п. о. (B9) — локализовали блот-гибридизацией с ³²P-меченым синтетическим зондом d(GCTATGCATGGTTCCTTGGTAACTTCTAGTTTG), соответствующим центральной части гена *psbA* табака, структура которого была установлена ранее [35]. Изначально ген *psbA* клонировали в виде фрагмента E8 в плазмиде рTZ19R со штаммом *E. coli* MH1 в качестве хозяина. Одна из плазмид, рTSecE81, была использована для определения структуры гена *psbA*. При расеве около 1000 колоний на чашку гибридизация с нитроцеллюлозной репликой давала несколько десятков позитивных ответов.

На рис. 1 приведена рестриктивная карта клонированного нами *EcoRI*-фрагмента и стратегия определения его нуклеотидной последовательности. Анализ структуры гена выявил делецию одного нуклеотида в его 3'-кодирующей области.

Было осуществлено повторное лигирование фрагмента хлДНК E8 в рTZ19R и трансформация реакционной смесью штамма *E. coli* MH1.

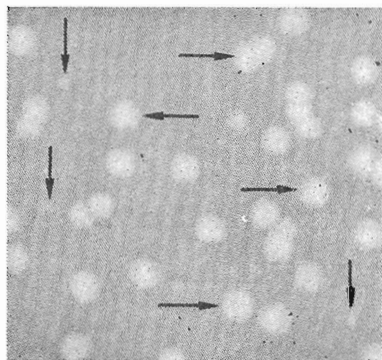


Рис. 2. Фрагмент чашки Петри с колониями *E. coli*. Стрелками отмечены колонии разных размеров, давшие положительный сигнал с ^{32}P -меченым олигонуклеотидным зондом

Для определения целостности структуры гена использовали вновь полученные плазмиды pTSecE82 и pTSecE83. Стратегия секвенирования гена *psbA* этих плазмид также приведена на рис. 1. Как и в предыдущем случае, при анализе нуклеотидной последовательности гена *psbA* было обнаружено по одной моноклеотидной делеции. Нуклеотидная последовательность фрагмента E8 с учетом делеции в структуре гена приведена в работе [32]. Интересно, что нуклеотидные делеции в структуре гена у плазмид pTSecE81 и pTSecE82 совпадают и расположены в участке 2011—2014. Плазмида pTSecE83 несет делецию в области 1906—1907 (см. рис. 4). В обоих случаях сдвиг рамки считывания приводит к появлению стоп-кодонов в непосред-

ственной близости (через 3 триплета) к месту делеции и, как следствие, к преждевременному обрыву образующегося белка. Характерная особенность нуклеотидных делеций — место их расположения: обе они приходятся на район триплетов, кодирующих аминокислотные остатки Phe²⁵⁵ и Thr²²⁰. Из экспериментов на *Chlamydomonas reinhardtii* известно, что Phe²⁵⁵ и Val²¹⁹ участвуют в образовании ниши, связывающей хинон (Q_B) и гербициды [36].

Таким образом, результаты секвенирования показывают, что для клетки *E. coli* ядовит участок полипептидной цепи белка D1 за его четвертым α -спиральным трансмембранным сегментом.

Известно, что ген *psbA* обладает промотором, структурно очень близким к консенсусной последовательности промотора *E. coli* [37, 38]. Чтобы избежать в хозяине экспрессии чужеродного белка, ген *psbA* был клонирован без промоторной области в составе *Bgl*II/*Bam*HI-фрагмента длиной 3,9 т. п. о. в *Bam*HI-сайт полилинкера плазмиды pSP64. Клоны *E. coli* (МН1), содержащие рекомбинантные плазмиды pSsecB, были представлены в равном соотношении колониями двух размеров (из данных по гибридизации) (рис. 2). Рестриктивный анализ плазмид pSsecB из четырех мелких и четырех нормальных по размеру колоний выявил различие между ориентацией *Bgl*II/*Bam*HI-фрагмента по отношению к SP6-промотору. Все плазмиды, выделенные из колоний одного размера, имели одинаковую ориентацию фрагмента. В плазмидах, выделенных из мелких колоний, ген *psbA* был клонирован в обратной ориентации по отношению к SP6-промотору. Эти результаты позволяют сделать предположение, что размер трансформантов *E. coli* штамма МН1 обусловлен ориентацией в плазмиде клонированного хлоропластного фрагмента. Следует отметить, что при замене штамма МН1 на JM109 данная закономерность не соблюдалась.

При определении целостности структуры гена *psbA* использовали две рекомбинантные плазмиды pSsecB с разной ориентацией клонированного гена. Секвенирование 3'-кодирующих областей между сайтами *Hind*III и *Hinc*II проводили с использованием «сдвигающегося праймера» [39]. Анализ полученных результатов не выявил наблюдавшихся ранее нуклеотидных делеций в структуре гена *psbA*.

Наряду с вышеописанными рекомбинантными плазмидами ген *psbA* клонировали также с промотором в составе фрагмента В9 в плазмиде pSP64. На рис. 3 приведена рестриктивная карта фрагмента и стратегия определения его частичной нуклеотидной последовательности. Мутаций в структуре гена *psbA* и его промоторной области плазмиды pSsecB9 не выявлено. Вероятно, при клонировании полноразмерного гена *psbA* важное значение имеет выбор вектора и штамма хозяина, а влияние собственного промотора не столь критично, хотя при определенных условиях влияние

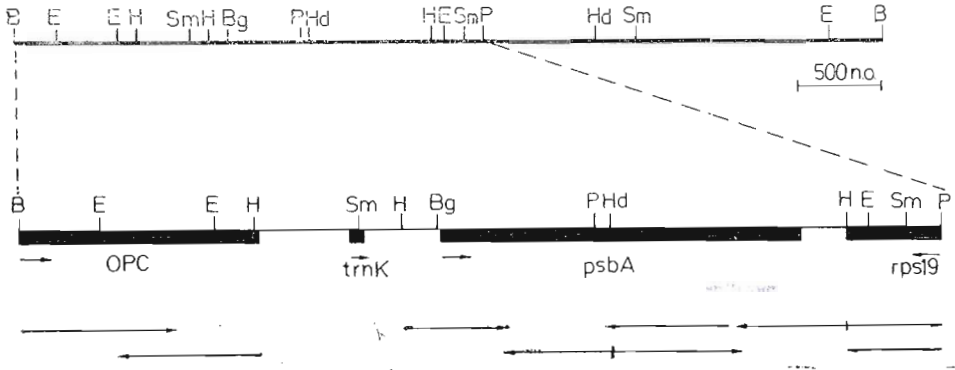


Рис. 3. Рестриктивная карта *Bam*HI-фрагмента (B9) хлДНК ржи длиной 5,1 т.п.о. Стрелками указаны направление и протяженность секвенирований. Гены *psbA*, 3'-экзон *trnK* и ОРС транскрибируются слева направо, а *rps19* — в обратном направлении, B — *Bam*HI, Bg — *Bgl*II, E — *Eco*RI, H — *Hind*III, P — *Pvu*II, Sm — *Sma*I

промоторной области не исключается и может сказаться при клонировании гена *psbA* [28]. На рис. 4 приведена нуклеотидная последовательность участка *Bam*HI/*Pvu*II длиной 2729 п. о.

Из полученных нами данных следует, что на расстоянии 229 п. о. перед первым иницирующим триплетом гена *psbA* расположен 3'-экзон гена *trnK*, кодирующего тРНК лизина, а еще выше перед ним — 3'-концевая область открытой рамки считывания (ОРС542 у риса или ОРС509 у табака [40, 41]). 3'-Экзон гена *trnK* хлДНК ржи на один нуклеотид короче экзона ячменя и имеет одну замену по сравнению с последовательностью гена из табака. Степень структурной гомологии (67,5%) продукта длиной 237 аминокислотных остатков, выведенного на основании неполной структуры ОРС ржи, с соответствующей областью последовательности табака в 2 раза превышает степень гомологии (34,3%) полных продуктов этих ОРС для табака и печеночного мха [30].

Значительный интерес представляет область, прилегающая к 3'-кодирующей части гена *psbA*. У большинства двудольных растений за геном *psbA* следует ген *trnH*, причем район между этими генами очень пластичен и отличается наличием вставок или делеций. Показано, что изменения в данном районе не нарушают функционирования пластома. На этом основании высказано предположение, что район между генами *psbA* и *trnH* — потенциальный сайт для генетической инженерии [42]. У однодольных же ген *psbA* максимально приближен к одному из больших инвертированных повторов, разделяющих кольцевую ДНК хлоропластов на две уникальные области, причем между ним и геном *trnH* находится противоположно ориентированный ген *rps19* [22].

Сравнение нуклеотидной последовательности между терминирующими кодонами генов *psbA* и *rps19* ржи и последовательностями хлДНК ячменя и риса наряду с высокой гомологией этих структур (82% для ячменя и 61% для риса) выявило также определенную вариабельность (рис. 5). Сразу за ТAA-кодоном гена *psbA* риса следует 18-нуклеотидная делеция. Далее через 14 п. о. у ржи также отсутствуют 9 п. о., имеющиеся у риса и ячменя. Здесь же расположена и характерная шпильчатая последовательность, участвующая скорее всего в процессинге и стабилизации мРНК [43]. У злаковых при высокой консервативности структуры инвертированного повтора наблюдается лабильность в области петли. В одной из секвенированных нами плазмид рSSecB в петле этой шпильки была установлена нуклеотидная последовательность, отличающаяся от ранее определенной структуры (у пяти плазмид). Интересно, что по нуклеотидной последовательности петли у данной плазмиды полностью идентична петле аналогичной шпильки хлДНК ячменя (рис. 6). Можно предположить, что имеется несколько популяций хлДНК, различающихся незначительными изменениями генетического материала, что скорее всего отражает динамику эволюционного процесса.

1 GGATCCTCTTATGCATATGTTGCATCAAGGAAAGCAATTCCTGCATCAAAAGGCCACTTTTTTTTTGAAGAAGAAATGGAATCCTACCTTATAAAT
D P L M H Y V R Y O G K A I L A S K G T F F L K K K W K C Y L I N

101 TTCTGGCAATATTATTTCTGTTTTGGACTCAGCCGGGAAGAATCCATATAAACCAATAGCAAACTCTTGCTTCGATTTTATGGGGTACCTTTCAAGTG
F W Q Y Y F C F K T O P R R I H I N O L A N S C F D E M G Y L S S

201 TACCAAAAAGTCTTCTGTTAGTAAAGGAATCAATGCTGGAGAATCATTCTAATAGACTCGAATGAAAAAATTCGATACCATAGTCCCGCTACTCT
V P K S S L I V R N O M L E N S F L I D T R M K K F D G I V P A T L

301 CCTCATAGGATACCTTACAAAAGCTCAATTTGCTACTGGATCGGGGCATCCTATTAGTAAACCCATTTGGACAGATTATCAGATTGGGATATCTTGAT
I I G Y L S K A O F C T G S G H P I S K P I W T D L S D W D I L D

401 CGATTTGGTCGGATATGAGAAATCTTTTCATTATCATAGTGGATCTCGAAAAAACAGACTTTGATCGACTAAAGTATATACTTCGACTTTTCATGGC
R F G R I C R N L F H Y H S G S S K K Q F L Y R G K G Y P I L R L S C

501 CTAGAACCTTAGCTGTAAACATAAAAGCAGCGTACGAACCTTTTAGCAACGATTTGGTTCGGTATTTTAGAAGAATCTTTATGGAAGAAGAGCAAGT
A R I I A R K H K S I A R I E M O R I G S V F L E E F F M E E E Q V

601 TTTTCTTGAAGTTCAGCAAAAACATCTTTTCTTTCGTTGGATCACACACTGAGCGTATTTGGTATTTGGATATTACGTATCAATGACCTGGCTC
F S I M F T K T I I F S F C G S H T E R I W Y I D I I R I N D L V

701 AACCTCTTAATAATCATGAGACGAAATGAGAAACAAGAAAGGGTGTAAATGATCAAGAAAAAATCTTCCATTTTTCATTCTGAAATGTTCTTTT
N P L N *

801 IATTTTATTAAGAAGAGTAGGTGAATCAACTTACIAAIAAAAAAATAGTAGAACTAECTCCCTCTTGAATAGAAATGGCTATTCTCATACATAC
901 GGAAAGCTGTCGCAATGAAAAAGCAAGCCAGATTGGGGAGGGATTTTCTCTATGTAAACAGGAAGTATCTACTCCATCCGACTAGTTCGGGG
1001 TTCCGACTCCCGGGCAACCCATATAGAAAAGACCATCAAGTTTAACTTTGACTCAGTTCATTTACAAATACAAAATTTGGTTTGGTTAAATTTAGT
-----trnK Exon-----
1101 TATATGGATAGCTAATCTTTGGCTGACTGGTTGACATGCTATATAGTCTATGTTATAGTGTAAATAACAAGCCCTCTATATCTATATTCTAGTTA
1201 ATACGTGTGCTTTGGGACTCTTCCAATTTGAATAAACCAAGATCTTACCATGACTGCAATTTAGAGAGAGCCGGAAGTACAAGCCGTGGGGTCGCTTC
M I A I L E R E S T S L W K F F

1301 TGCAACGGATAACTAGCAGTAAAAATCGTCTTACATCCGATGGTTCGGTGTTTGATGATCCCTACCTTATTGACTGCAACTCTGCTATTATATCG
C N W I T S I E X R L Y I G W F G V L M I P T L L I A T S V F I I

1401 CCTTCATCGCTCCCTCCAGTAGATATTGATGGTATTCGTGAGCCCTTTCCTGGTCTTTACTTTATGGAACAATATTATCTCTGGTCTATTATCCC
A F I A A P P V D I D G I R E P V S G S L L Y G N N I I S G A I I P

1501 TACTTCTGCGGGCATCGGATTCACCTTTACCAATTTGGGAAGCTGCATCTGTTGATGAGTGGTTATACAATGGTGGCTCTTAGCTAAATGTTCTA
T S A A I G I H F I Y P I W E A A S V D F M L E R G K G Y P I L I V L

1601 CACTTCTACTTGGTGTAGCTTGTATATGGGTGCTGAGTGGGAACCTAGTTCCGCTGGGTATGGCTCCTGGATGCTGTGCATATTGAGTCTGCTG
H F L L G V A C Y M G R E W E L S F R L G M R P W I A V A Y S A P

1701 TTGCAGCTGCTACTGCTTTTTCTGATTTACCTATTTGGTCAAGGAAGCTTTCTGATGGTATGCCITTAGGAATCTCTGGTACTTTCAACTITATGAT
V A A A T I A V F L I Y P I G O G S F S D G M P I G I S G T F N F M I

1801 TGTATCCAGGCAGACACAACCTTATGCATCCATCCACATGTTACGTTAGCTGGTGTATTCGGCGGTTCCCTATTCACTGCTATGCAATGGTCTCC
V F O A E H N I H F N I M L F H M L G V A G V F G C S L F S A M H G S

1901 TTGGTAACCTCTAGTTTGCATCAGGAAACTACGAAATGAATCTGCTAATGAGGGTTACAATAATTTGGTCAAGAGGAGAGACTTATAAATTTGGCTG
L V I S S L I R F I T E N E S A N E G Y K F G Q E E E T Y N I V A

2001 CTCATGGTATTTGGCCGATTAATCTCCAAATAGCTAGTTTCAACAACCTCTGCTCTTACACTCTCTCTGGCTGCTGGCCCTGACTAGGAATCTG
A H G Y F G R L I F O Y A S F N N S R S L H F F L A A W P V V G T W

2101 GTTCACTGCTTAGGTTAGTACTA:GGCTTTCACCTAAATGGTTTCAATTTCAACCAATCTGATGATAGTCAAGTCCGGTATTAAATCTGG
F T A L G I S I H F I N I L Y G F N F N Q S V L T G C G R V I N T W

2201 CCTCATATCATCAACCGTCTAACCTTGTATGGAAGTAAAGCAAGCTAATGCTCACAACCTCCCTCTAGACTTAGCTGTGTTGAAGTCCATCTA
A D I I N R A X L G M F V M H E R X A H N F P L D L A A V E V P S

2301 TTAATGGATAAGGTTTTCTGCTAACATATAAGAATTTTGAAGACAGAAATACCAATATCTGCTAGAACAAGATTTGGTATTTCTTATTTTGA
I N G *

2401 TCTTTTTTCTCTTAATCTTCTATTTCAGAACTGATCAAGTAAAGCAGAGAFTAGTATCCTTTCTGCAATTTTCATAACTCGTGAAATGCCGACTA
2501 GGCACGAATCCCCCAATTTGGCAGCTACCAATAGGATTGTTATGTAATAGGTATATGTTCCCTTCCATATGAATCCGGATTTGATGGCCAACCAATG
2601 TGGGTAGAATGCTAGATGCCCGGACCCAGTCTACTAATGTTCTTCTCTCTCTTCATATGACCTTTTCTATCTTTGCCAATAAATGATGAGCTACAAA
2701 AGGATTCGTTTTTTTTCTGCTGACAGCTG

Рис. 4. Нуклеотидная последовательность *Bam*HI/*Pvu*II-фрагмента хпДНК ржи, включающего в себя гены *psbA* (1250—2311), *rps19* (2724—2443), 3'-экзон *trnK* (986—1020), 3'-кодирующую область ОРС (1—715) и выведенные на ее основе аминокислотные последовательности белка D1 и продукта ОРС. Подчеркнуты предполагаемый рибосомсвязывающий сайт, —35- и —10-районы промотора, а также 15-нуклеотидная последовательность, комплементарная синтетическому праймеру, использованному при подтверждении структуры гена *psbA* плазмид рSSecB. Стрелками обозначен инвертированный повтор

Сравнение последовательности гена *psbA* ржи с известными структурами одно- и двудольных растений выявляет их высокую консервативность. Так, в гене ячменя относительно гена ржи изменено 5 из 1062 п.о. (T⁶⁰, C¹²⁰, C¹⁹², T²⁴⁹ и G¹⁰⁴⁸), составляющих этот ген (гомология 99,5%), а в гене табака — 85 п. о. (гомология 92%), тогда как в аминокислотной последовательности белка D1 ржи имеется только одна замена по сравне-

ter (psbA)
 1 TAAGGTTTTTCTGCTAACATATAAGAATTTTTGAA-----GACAGAAATACCCAATATCTTCGIAGAACAAGATATTCGGTATTTCTTATTTTGA
 2GAAAGAAA.....A.....T.CT.C
 3CC.....GAAAGGAAA.CT.....GA.G

ter (rps19)
 1 ATCTTTTTTTTTCTTCTTAATCTTTCTATTCAGAATCTGATCAGTTA
 2
 3 -.T.....A..T.C.....T.....

Рис. 5. Сравнение нуклеотидных последовательностей между стоп-кодонами генов *psbA* и *rps19* ржи (1), ячменя [27] (2) и риса [22] (3). В последовательностях 2, 3 точками обозначены одинаковые с последовательностью 1 нуклеотиды; черточками обозначены делеции

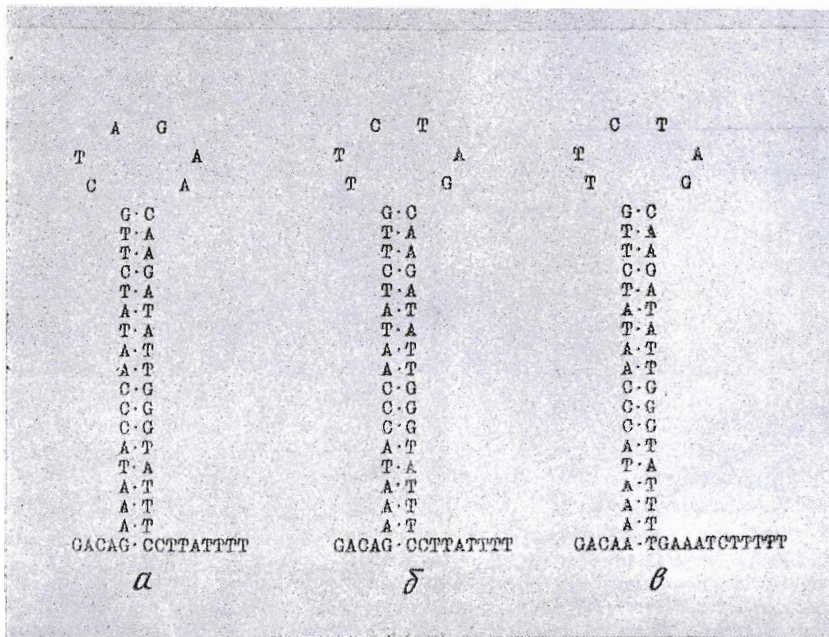


Рис. 6. Нуклеотидная последовательность инвертированного повтора, расположенного за 3'-концом гена *psbA* ржи у пяти плазмид (*а*) и у одной плазмиды pSSecB (*б*), а также ячменя (*в*)

нию с ячменем и шесть замен по сравнению с табаком. У риса заменены 18 нуклеотидов (гомология 98,2%), и только три замены ведут к изменению аминокислотных остатков. Первичные структуры белков D1 ржи и пшеницы полностью совпадают. Все замены у продукта гена *psbA* высших растений в области COOH-конца приносятся на участок, отщепляемый в ходе посттрансляционного процессинга. На рис. 7а приведены аминокислотные последовательности продуктов генов *psbA* высших растений, мха, *Chlamydomonas reinhardtii* и цианобактерии, расположенных в порядке убывания гомологии с последовательностью ржи. Даже при сравнении с эволюционно далекой цианобактерией *Anabaena* 7120 обращает на себя внимание консервативность структур, за исключением концевых участков. При этом степень структурной гомологии белка D1 ржи выше, чем у ранее опубликованного 47-кДа полипептида [47].

Гораздо меньшую консервативность проявляет нуклеотидная последовательность генов *rps19* ржи и табака (гомология 75%) [48]. Кроме того, ген *rps19* ржи характеризуется делецией трех нуклеотидных остатков в 5'-кодирующей области и вставкой шести нуклеотидных остатков в 3'-кодирующей области. Продукт гена—рибосомный белок S19 ржи, как и других однодольных [40, 49], на один аминокислотный остаток длиннее аналогичных структур двудольных растений и состоит из 93 аминокислотных остатков [48, 50, 51] (рис. 7в).

Авторы выражают благодарность Н. С. Быстрову за синтез олигонуклеотидов.

1 MTAILERREESTSLWGRFCNNITSTENRLYIGWGVLMIPITLLTATSVFIIAFIAAPPVVDIGIREPVSGSLYGNIIISGAIPTSAAGLHFYPINEAA
 2
 3 E
 4 D. EN
 5 T A. I D. V
 6 S A E I C T V N
 7 TT. QG. S. ANV. E T I. V A. VC V A I VV. S. N

1 SVDEHLYNGGPPYELIVLRFLLGVACVYNGREWELSPRLGNRPWIAVAYSAPVAAATAVFLIYPIGOGSESDGHPLGISGTFNFNIVFQAERNILMHFFHML
 2
 3
 4
 5 Y
 6 L Q C Y S V
 7 L Q. VIF I. C L. Q Y C L. S

1 GVAGVFGGSLFSAMHGSVLTSSLIRETENESANEGYKFGQEEETYNIVAANGYFGRLFOYASFNNRSRLHFFLAANPVVGIWFTALGISTMAFNLNGF
 2 R
 3 R
 4 R
 5 A
 6 R I
 7 V I Q. Y Q I V

1 MENSQVVDGQRVINTWADIINRANLGMVNHERNANFPDLAAVE-----VPSING
 2 L 99.1%
 3 I A. T 98.6%
 4 I A 98.3%
 5 A. AV 97.2%
 6 L STN SS. N 93.2%
 7 IL G. VAPVALTA. A 84.1%

1 NTR-KKTRPFVANHLLAKIEKVNKKEKEITVTSRASSILPTMVGHITIAIHNGKENIPIYITNPMVGRKLGFEVPTRHFTSYENARKDTKGRR 93
 2 R I A ST 93 95%
 3 SL. K N K. D. L. T. A I T. I I L DS H A. LN -RGH. KS. NR 92 69%
 4 SL. K N R L. K. A I T. I I R. L DR H A. LN -RGH. KN. N 92 70%
 5 SI. KG D K ML. L. K. KI. I T. V I V Q. L DR H A. T -RGH. KN. K 92 66%

Рис. 7. Сравнение аминокислотных последовательностей однотипных белков разных видов растений: а — продукт гена *psbA* ржи (*Secale cereale*) (1), риса (*Oryza sativa*) [22, 34] (2), табака (*Nicotiana tabacum*) [35] (3), гороха (*Pisum sativum*) [44] (4), печеночного мха (*Marchantia polymorpha*) [30] (5), хламидомонады (*Chlamydomonas reinhardtii*) [45] (6), цианобактерии (*Anabaena 7120*) [46] (7). Предполагаемые трансмембранные сегменты отмечены штриховой линией. б — продукт гена *rps19* ржи и других видов растений. Обозначения как в рис. 7а, за исключением кукурузы (*Zea mays*) [49] (2) и шпината (*Spinacia oleracea*) [50] (4). Точками обозначены одинаковые аминокислоты, дефисами — делеции

Экспериментальная часть

Хлоропластную ДНК выделяли как описано в работе [47]. Расщепление ДНК вели эндонуклеазами рестрикции фирм НПО «Фермент» (Вильнюс), BRL и Reanal.

В работе использовали штаммы *E. coli* МН1, JM109, плазмиды рTZ19R (Pharmacia), рSP64 (Promega Biotec., США), ферменты Т4-полинуклеотидкиназу, щелочную фосфатазу из кишечника телят (САР) фирмы Pharmacia, Т4-ДНК-лигазу и ДНК-полимеразу I *E. coli* (фрагмент Кленова) фирмы Pharmacia и НПО «Фермент». Набор для секвенирования с ферментом секвеназой фирмы USB (США) любезно предоставил д-р М. Алам (Пульман, США).

Химический синтез олигонуклеотидов проведен (Н. С. Быстров) фосфоамидитным методом на синтезаторе Applied Biosystem (США). Олигонуклеотиды метили по 5'-концу [γ -³²P]АТФ (>5000 Ки/ммоль, Amersham) с помощью полинуклеотидкиназы [52]. Дефосфорилирование векторов на основе плазмид рTZ19R и рSP64 проводили согласно работе [52].

Расщепленную рестриктазами хДНК анализировали электрофорезом в 0,6% агарозном геле. Для гибридизации использовали нитроцеллюлозные фильтры фирмы Schleicher und Schuell. Однонаправленный блот-перенос вели согласно работе [52]. После блот-гибридизационного анали-

за фрагменты хлДНК разделяли в 0,6% легкоплавком агарозном геле с последующим вырезанием участков геля, содержащих набор *EcoRI*-фрагментов размером 1,8—2,0 т.п.о. и *VamNI*-фрагментов размером 5,0—5,2 т.п.о. Элюцию фрагментов ДНК из легкоплавкой агарозы осуществляли согласно работе [52]. Часть элюированного материала *VamNI*-фрагментов обрабатывали ферментом *BglII*. *EcoRI*-фрагменты лигировали в *EcoRI*-сайт плазмиды рTZ19R, а *VamNI*- и *BglII* / *VamNI*-фрагменты — в *VamNI*-сайт плазмиды рSP64. Трансформацию клеток *E. coli*, выделение и рестриктивный анализ плазмидной ДНК проводили согласно работе [47].

Нуклеотидные последовательности клонированных ДНК определяли по методу Сенгера с модификациями, как описано ранее [47], и с помощью секвеназы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Namba O., Satoh K. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1987. V. 84. № 1. P. 109—112.
2. Barber J. // Trends Biochem. Sci. 1987. V. 12. № 3. P. 123—124.
3. Chua N.-H., Gillham N. // J. Cell Biol. 1977. V. 74. № 2. P. 441—452.
4. Hirschberg J., Bleecker A., Kyle D. J., McIntosh L., Arntzen C. J. // Z. Naturforsch. 1984. B. 39c. № 5. S. 412—420.
5. Kyle D. J. // Photochem. and Photobiol. 1985. V. 41. № 11. P. 107—116.
6. Debus R. J., Barry B. A., Sithole I., Babcock G. T., McIntosh L. // Biochemistry. 1988. V. 27. № 26. P. 9071—9074.
7. Barber J. // Nature. 1988. V. 332. № 6160. P. 111—112.
8. Marder J. B., Goloubinoff P., Edelman M. // J. Biol. Sci. 1984. V. 259. № 5. P. 3900—3908.
9. Minami E., Watanabe A. // Plant Cell Physiol. 1985. V. 26. № 5. P. 839—846.
10. Takahachi M., Shiraishi T., Asada K. // FEBS Lett. 1988. V. 240. № 1/2. P. 6—8.
11. Michel H., Hunt D. F., Sabanowitz J., Bennet J. // J. Biol. Sci. 1988. V. 263. № 3. P. 1123—1130.
12. Marder J. B., Telfer A., Berber J. // Biochim. et biophys. acta. 1988. V. 932. № 3. P. 362—365.
13. Mattoo A. K., Edelman M. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1987. V. 84. № 6. P. 1497—1501.
14. Klein R. R., Mullet J. E. // J. Biol. Chem. 1986. V. 261. № 24. P. 1138—1145.
15. Schuster G., Pecker I., Hirschberg J., Kloppstech K., Ohad I. // FEBS Lett. 1986. V. 198. № 1. P. 56—60.
16. Ohad I., Kyle D. J., Hirschberg J. // EMBO J. 1985. V. 4. № 7. P. 1655—1659.
17. Karabin G. D., Farley M., Hallick R. B. // Nucl. Acids Res. 1984. V. 12. № 14. P. 5801—5812.
18. Rodermel S. R., Bogorad L. // J. Cell Biol. 1985. V. 100. № 2. P. 463—476.
19. Fromm H., Devis M., Fluhr R., Edelman M. // EMBO J. 1985. V. 4. № 2. P. 291—295.
20. Klein R. R., Mullet J. E. // J. Biol. Chem. 1987. V. 262. № 9. P. 4341—4348.
21. Palmer J. D., Edwards H., Jorgensen R. A., Thompson W. F. // Nucl. Acids Res. 1982. V. 10. № 21. P. 6819—6832.
22. Kanno A., Hirai A. // Plant Sci. 1989. V. 59. № 1. P. 95—99.
23. Laing W., Kreuz K., Apel K. // Planta. 1988. V. 176. № 2. P. 269—276.
24. Breidenbach E., Jenni E., Leu S., Boschetti A. // Plant Cell Physiol. 1988. V. 29. № 1. P. 1—7.
25. Xiao W. // Mol. Gen. Genet. 1988. V. 214. № 2. P. 307—312.
26. Brears T., Schardl C. L., Lonsdale D. M. // Plant Mol. Biol. 1986. V. 6. № 3. P. 171—177.
27. Ефимов В. А., Андреева А. В., Дмитракова Е. В., Пашкова И. Н., Ревердатто С. В., Юнг Р., Чазмазчева О. Г. // Биоорг. химия. 1988. Т. 14. № 8. С. 1117—1121.
28. Janssen I., Jakowitsch J., Michalowski C. B., Bohnert H. J., Löffelhardt W. // Curr. Genet. 1989. V. 15. № 5. P. 335—340.
29. Edelman M., Goloubinoff P., Marder J. B., From H., Devis M., Fluhr R., Mattoo A. K. // Molecular form and function of the plant genome. V. 83 / Eds Van Vlioting-Doting L., Groot G. S. P., Hall T. S. V. N. Y.: Plenum Press, 1984. P. 291—300.
30. Umesono K., Inokuchi H., Shiki Y., Takeuchi M., Chang Z., Fukuzawa H., Kohchi T., Shirai H., Ohyama K., Ozeki H. // J. Mol. Biol. 1988. V. 203. № 2. P. 299—301.
31. Boger S. K., Mullet J. E. // Nucl. Acids Res. 1988. V. 16. № 16. P. 8184.
32. Kolosov V. L., Bukharov A. A., Zolotarev A. S. // Nucl. Acids Res. 1989. V. 17. № 4. P. 1759.
33. Barros M. D. S., Dyer T. A. // Theor. Appl. Genet. 1988. V. 75. № 4. P. 610—616.
34. Wu N.-H., Cote J.-C., Wu R. // Dev. Genet. 1987. V. 8. № 5/6. P. 339—350.
35. Sugita M., Sugiura M. // Mol. Gen. Genet. 1984. V. 195. № 1/2. P. 308—313.

36. Erickson J. M., Rahire M., Rochaix J. D., Mets L. // Science. 1985. V. 228. № 4696. P. 204—207.
37. Hanley-Bowdoin L., Chua N.-H. // Trends Biochem. Sci. 1987. V. 12. № 2. P. 67—70.
38. Hanley-Bowdoin L., Chua N.-H. // Plant Mol. Biol. 1988. V. 10. № 4. P. 303—310.
39. Strauss E. S., Kobori J. A., Siu G., Hood L. E. // Anal. Biochem. 1986. V. 154. № 1. P. 353—360.
40. Hiratsuka J., Shimada H., Whittier R., Ishibashi T., Sakamoto M., Mori M., Kondo C., Honji Y., Sun C.-R., Meng B.-Y., Li Y.-Q., Kanno A., Nishizawa Y., Hirai A., Shinozaki K., Sugiura M. // Mol. Gen. Genet. 1989. V. 217. № 2/3. P. 185—194.
41. Sugita M., Shinozaki K., Sugiura M. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1985. V. 82. № 11. P. 3557—3561.
42. Aldrich J., Cherney B. W., Merlin E., Christopherson L. // Curr. Genet. 1988. V. 14. № 2. P. 137—146.
43. Stern D. B., Gruissem W. // Cell. 1987. V. 51. № 6. P. 1145—1157.
44. Oishi K. K., Shapiro D. R., Tewari K. K. // Mol. Cell. Biol. 1984. V. 4. № 1. P. 2556—2563.
45. Erickson J. M., Rahire M., Rochaix J. D. // EMBO J. 1984. V. 3. № 12. P. 2753—2762.
46. Curtis S. E., Haselkorn R. // Plant Mol. Biol. 1984. V. 3. № 2. P. 249—258.
47. Бухаров А. А., Колосов В. Л., Золотарев А. С., Абдулаев И. Г. // Биоорган. химия. 1989. Т. 15. № 7. С. 927—939.
48. Sugita M., Sugiura M. // Nucl. Acids Res. 1983. V. 11. № 6. P. 1913—1918.
49. Larrinua I. M., McLaughlin W. E. // Progress in photosynthesis research. V. 4 / Ed. Biggins J. Dordrecht: Nijhoff Publishers, 1987. P. 649—652.
50. Zurawski G., Bottomley W., Whitfeld P. R. // Nucl. Acids Res. 1984. V. 12. № 16. P. 6547—6558.
51. Fukuzawa H., Kohchi T., Sano T., Shirai H., Umesono K., Inokuchi H., Ozeki H., Ohyama K. // J. Mol. Biol. 1988. V. 203. № 2. P. 333—351.
52. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии: молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984.

Поступила в редакцию
9.X.1989

V. L. KOLOSOV, A. S. ZOLOTAREV

RYE PHOTOSYSTEM II: CLONING AND SEQUENCING FRAGMENTS
OF CHLOROPLAST DNA COMPRISING *psbA* GENE CODING FOR D1 PROTEIN

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

EcoRI and *BamHI* fragments of rye chloroplast DNA comprising *psbA* gene were cloned and a 2729 bp region was sequenced. Cloning of *EcoRI* fragment into pTZ19R plasmid led to a single nucleotide deletion in the coding region of *psbA* gene. A scheme of full-length *psbA* gene cloning is proposed, allowing one to escape the damage effect of the *psbA* gene expression product on the host cell. The differences between monocot and dicot in nucleotide sequences of DNA downstream of *psbA* genes are discussed. Gene *rps19* is located 131 bp downstream from *psbA* gene on the complementary strand. The amino acid sequences of D1 and S19 proteins of different species are compared.