



УДК 547.963.32

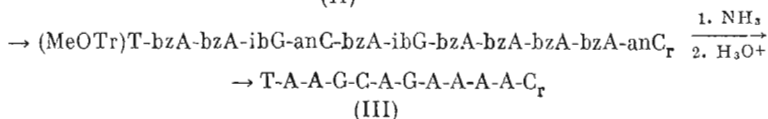
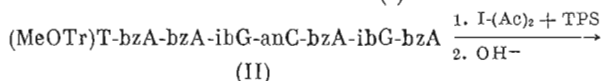
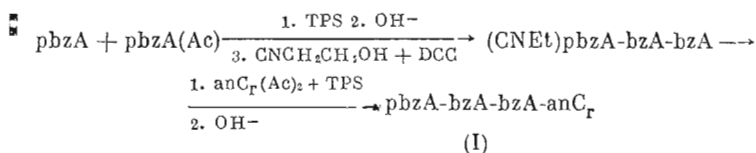
## НУКЛЕОТИДНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ СЕГМЕНТА ДНК БАКТЕРИОФАГА $\phi$ X174, ПРЕДШЕСТВУЮЩЕГО УЧАСТКУ СВЯЗЫВАНИЯ РИБОСОМЫ

*Берлин Ю. А., Грачев С. А., Казан М. З.,  
Колосов М. Н., Коробко В. Г.*

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

Для выяснения механизма транскрипции значительный интерес представляет структура регуляторных участков генома, в особенности промоторов и терминаторов. Ранее при изучении ДНК бактериофага  $\phi$ X174 были определены первичная структура участка, связывающегося с рибосомой *E. coli* и содержащего сайт инициации транскрипции гена *G*, а также прилегающая к нему пентануклеотидная последовательность [1, 2]. В настоящем сообщении описывается структурный анализ 27-членного сегмента ДНК  $\phi$ X174, включающего 5'-концевой динуклеотид этого участка связывания рибосомы.

Анализ проводился по методу Сэнгера и Коулсона [3] путем иницированного праймером синтеза (—)-цепи ДНК  $\phi$ X174 с помощью ДНК-полимеразы А на фаговой (+)-цепи ДНК в качестве матрицы с использованием лимитирующих наборов дезоксинуклеозидтрифосфатов (минус-системы). Праймером служил додекануклеотид T-A-A-G-C-A-G-A-A-A-C<sub>T</sub> (III), который был синтезирован из октануклеотида (II) [4] по приведенной ниже схеме\*. Его строение было подтверждено введением 5'-концевой метки (при помощи [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] гАТФ и Т4-полинуклеотидкиназы) с последующим частичным гидролизом фосфодиэстеразой змеиного яда и двухмерным разделением <sup>32</sup>P-меченых продуктов гидролиза (электрофорез на ацетилцеллюлозе и гомохроматография).



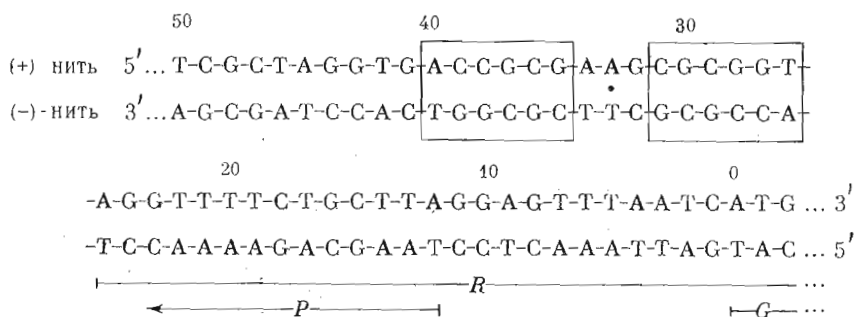
\* Поскольку статья посвящена структуре ДНК, [префикс d- для краткости всюду опущен.]

### Электрофоретический анализ продуктов синтеза в минус-системах

Минус-система	Последовательность на электрофореграмме			
—А		I		I I I I
—С	I	I I	I I	I I I I
—G			I I	I I I I
—Т	I		I I	I I

Результат анализа: C-T-A-C-C-G-C-G-C-T-T-C-G-C-G-G-T-C-A-C-C-T-A-G-C-G-A

Додекануклеотид (III) гибридизовали с (+)-цепью фаговой ДНК и элонгировали при помощи ДНК-полимеразы А и четырех дезоксирибонуклеотидтрифосфатов (один из которых был  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-меченым) с образованием набора олигонуклеотидов различной длины. Полученные олигонуклеотиды, всё еще гибридизованные с ДНК, далее наращивали с помощью той же полимеразы, но в присутствии только трех из четырех трифосфатов, используя поочередно все четыре возможные комбинации: АТР + СТР + ТТР (— G-система), АТР + ГТР + ТТР (—С-система), АТР + СТР + ГТР (— Т-система) и СТР + ГТР + ТТР (— А-система); смесь продуктов синтеза анализировали путем электрофореза в полиакриламидном геле (разделение по длине цепи). Поскольку рост каждой из олигонуклеотидных цепей прекращается в том месте, где в цепь должен был бы включиться нуклеотид, отсутствующий в данной минус-системе, этот анализ позволил определить положение соответствующих звеньев в (—)-цепи ДНК фX174 (таблица). В установленной таким образом 27-членной последовательности C-T-A-C-C-G-C-G-C-T-T-C-G-C-G-G-T-C-A-C-C-T-A-G-C-G-A (IV) первые 7 нуклеотидов были известны ранее [1, 2]. Полное совпадение полученных результатов с ожидаемыми в отношении этих нуклеотидов подтвердило специфичность гибридизации праймера с фаговой ДНК и достоверность считывания матрицы. В совокупности с литературными данными о строении участка связывания рибосомы [1] определение последовательности (IV) привело к изображенной ниже первичной структуре сегмента ДНК фX174, непосредственно предшествующего гену G (рисунок).



Первичная структура сегмента ДНК фага фX174, непосредственно предшествующего структурному гену G. Начальная точка отсчета (0) — первый нуклеотид инициирующего триплета АТG этого гена. Показаны начало гена G (G), 5'-концевой фрагмент участка связывания (+)-нити фаговой ДНК с рибосомой (R), положение синтетического праймера (P) на (+)-нити ДНК и направление его элонгации. В прямоугольнике заключены два комплементарных гексануклеотида с осью симметрии второго порядка в положении 33, расположенные в предполагаемом сайте рекогниции РНК-полимеразы. Последовательность 31—50 впервые установлена в настоящей работе

Недавно было показано, что в промоторах колифагов ( $\lambda$  и T7) сайты рекогниции и связывания РНК-полимеразы расположены соответственно в районе 30—35 и 7—13 нуклеотидов от точки инициации транскрипции [5, 6]. Исследованный нами сегмент ДНК  $\phi$ X174 имеет 50 нуклеотидных звеньев перед иницирующим кодоном, и поэтому, несмотря на отсутствие прямых генетических доказательств, представляется вероятным, что он содержит промотор гена *G*. Мы предполагаем, что в этом сегменте сайт рекогниции РНК-полимеразы находится в пентадекануклеотидном участке 26—40, который характеризуется наличием 10-членного палиндрома (C-G-C-G-A-A-G-C-G-C)·(G-C-G-C-T-T-C-G-C-G) и двух симметрично расположенных комплементарных гексануклеотидных последовательностей A-C-C-G-C-G и C-G-C-G-G-T, а по соотношению  $(G + C)/(A + T)$  отличается в 4 раза от пентадекануклеотида 1—15, расположенного рядом с местом начала транскрипции.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Barrell B. G., Weith H. L., Donelson J. E., Robertson H. D. (1975) *J. Mol. Biol.*, 92, 377—393.
2. Donelson J. E., Barrell B. G., Weith H. L., Kössel H., Schott H. (1975) *Eur. J. Biochem.*, 58, 383—395.
3. Sanger F., Coulson A. R. (1975) *J. Mol. Biol.*, 94, 441—448.
4. Берлин Ю. А., Долганов Г. М., Каган М. З., Колосов М. Н., Коробко В. Г., Полякова И. А., Честухин А. В., Шемякин М. Ф. (1976) *Биоорг. химия*, 2, 995—996.
5. Maniatis T., Ptashne M., Backman K., Kleid D., Flashman S., Jeffrey A., Maurer R. (1975) *Cell*, 5, 109—113.
6. Pribnow D. (1975) *J. Mol. Biol.*, 99, 419—443.

Поступила в редакцию  
8.VI.1976