



УДК 577.214.(337+622)

ХРОМОСОМНАЯ ЛОКАЛИЗАЦИЯ ГЕНОВ *rpb9⁺* И *tfal1⁺*, КОДИРУЮЩИХ КОМПОНЕНТЫ АППАРАТА СИНТЕЗА мРНК *Schizosaccharomyces pombe*

© 2000 г. Г. В. Шпаковский[#], Г. М. БарановаИнститут биоорганической химии им. М.М. Шенякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 17.03.2000 г. Принята к печати 25.03.2000 г.

С помощью гибридизации ДНК на космидных фильтрах высокой плотности ликвидирован последний пробел в картировании генов РНК-полимеразы II делящихся дрожжей *Schizosaccharomyces pombe* – установлена хромосомная локализация гена *rpb9⁺*, кодирующего одну из специфических субъединиц РНК-полимеразы II. Выяснена также первичная структура трех протяженных областей хромосомы I, в результате чего были идентифицированы гены, соседствующие с *rpb9⁺*. Одним из них оказался ген *Sz. pombe*, кодирующий большую (α -) субъединицу общего фактора инициации транскрипции TFIIIE и названный нами *tfal⁺*.

Ключевые слова: делящиеся дрожжи; хромосома I; гены *rpb9⁺*, *tfal⁺*, *pro3⁺*, *hag1⁺* и *sin1⁺*; субъединица Rpb9; РНК-полимераза II; общий фактор транскрипции TFIIIE.

ВВЕДЕНИЕ

Аппарат синтеза информационных РНК, затрагивающего почти каждый аспект жизнедеятельности эукариотической клетки, устроен довольно сложно. Один лишь базовый аппарат транскрипции структурных генов включает в себя РНК-полимеразу II, состоящую из 12 различных субъединиц [1–3], связывающийся с ТАТА-боксом белок ТВР [4] и ассоциированные с ТВР в составе многокомпонентного комплекса TFIIID другие узнающие промотор и/или осуществляющие регуляторные функции белки ТАФs (не менее 12 полипептидов) [5], а также общие факторы транскрипции: TFIIA (гетеротример) [5, 6], мономерный TFIIВ, TFIIF (гетеротетрамер из субъединиц двух видов) [7], TFIIЕ (также гетеротетрамер из двух видов субъединиц) [5, 8] и TFIIH (по крайней мере девять субъединиц) [5, 8]. По многокомпонентности и сложности функционирующий *in vivo* комплекс РНК-полимеразы II сопоставим, вероятно, лишь с рибосомой.

Недавно было завершено клонирование и первичная структурно-функциональная характеристика кДНК и генов всех 12 субъединиц РНК-полимеразы II делящихся дрожжей *Schizosaccharomyces pombe* [9–13]. Кроме того, для 11 из этих

генов была установлена их хромосомная принадлежность и, благодаря быстрому прогрессу европейского проекта по секвенированию генома *Sz. pombe*, даже точное положение на физической карте генома (см. <http://www.sanger.ac.uk>). Единственным исключением оставался ген *rpb9⁺*, кодирующий одну из специфических субъединиц РНК-полимеразы II [10, 12, 13]. Данная работа посвящена клонированию этого гена из геномной клонотеки *Sz. pombe*, определению его хромосомной локализации, а также установлению первичной структуры трех протяженных участков ДНК в составе геномной вставки, что позволило определить гены, соседствующие с *rpb9⁺*.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Клонирование и хромосомное картирование гена *rpb9⁺* *Sz. pombe*

Поиск гена *rpb9⁺* в представительной геномной клонотеке *Sz. pombe* [14] был осуществлен с помощью ПЦР по методу последовательных разведений клонотек [15, 16] с использованием специфических праймеров, сконструированных на основе литературных данных о первичной структуре гена [10]. В результате был получен клон рYUG7 и составлена подробная рестриктная карта геномной вставки *Sz. pombe* в составе этого клона (рис. 1). Точное картирование гена *rpb9⁺* в

[#] Автор для переписки (тел.: (095) 330-65-83; факс: (095) 335-71-03; e-mail: gvs@ibch.ru).

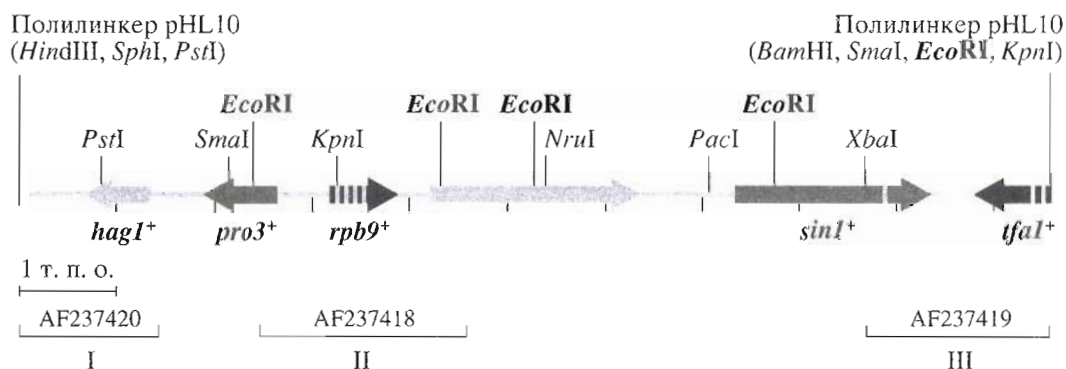


Рис. 1. Физическая и генетическая карта вставки ДНК *Sz. pombe* из геномного клона рYUG7, содержащего ген *rpb9*⁺. Показана ориентация вставки относительно вектора клонотекы рНL10 [14], римскими цифрами отмечены три области генома *Sz. pombe*, первичная структура которых установлена в настоящей работе. Белыми вертикальными полосками на генах *rpb9*⁺, *tfal*⁺ и *sinI*⁺ указаны положения интронов.

пределах геномной вставки облегчалось наличием в ней уникальных участков узнавания эндонуклеаз рестрикции *KpnI*, *SmaI* и *PstI*. Кроме того, очень удобным оказалось расположение участков расщепления рестриктазы *EcoRI*: четыре относительно небольших *EcoRI*-фрагмента, которые можно довольно легко извлечь из агарозного геля, покрывают почти всю геномную вставку. Именно эти фрагменты были использованы в качестве зонда для гибридизации (см. “Эксперимент. часть”).

Картирование гена *rpb9*⁺ на хромосомах *Sz. pombe* проводили с помощью гибридизации с фильтрами высокой плотности колоний трех космидных клонотек *Sz. pombe*, сконструированных с целью секвенирования генома делящихся дрожжей [17, 18] и содержащих набор клонов, покрывающих практически весь геном *Sz. pombe*. Сигналы гибридизации дали следующие космиды (см. рис. 2): р32В7, р8Е10, р13F11, р9D2 (библиотека в векторе рAd10sacB11 на основе бактериофага Р1 [17], третий из перечисленных клонов по данным PomBase /<http://www.sanger.ac.uk/> принадлежит хромосоме I); с17D4, с5Н9, с29G4, с7D12, с7D3; с9В4, с26G10, с7Н11; с7Н1, с8А11, с8А12, с10В2, с7Н10 (космидная библиотека ICRF на основе вектора Lawrist4 [17], по данным PomBase все эти клоны расположены на хромосоме I); с980 и с258 (космидная библиотека CSHL на основе вектора sCos1 [18], космида с980 также относится к хромосоме I [18]). Полученные данные однозначно свидетельствуют, что вставка ДНК *Sz. pombe* из плазмиды рYUG7, а следовательно, и ген *rpb9*⁺ расположены на правом плече хромосомы I в составе контиги № 7 [18]. Таким образом, завершено установление хромосомной локализации всех 12 генов *Sz. pombe*, кодирующих субъединицы РНК-полимеразы II (см. таблицу).

Изолированный нами геномный клон рYUG7 оказался расположенным в районе одного из неясных мест космидных карт хромосомы I *Sz. pombe* и в настоящее время внесен в сводную карту секвенирования генома делящихся дрожжей (см. http://www.sanger.ac.uk/Projects/S_pombe/Chr1.shtml). Это наш третий геномный клон (наряду с рYUK71 [19] и рYUL23 [20]) из заполнивших пробелы на физической карте генома *Sz. pombe* (http://www.sanger.ac.uk/Projects/S_pombe/Cloner.es.shtml) и потому вошедший в реестр клонов, используемых для установления полной первичной структуры генома делящихся дрожжей. Все три наши плазмиды картированы на хромосоме I среди 248 клонов, покрывающих на данный момент практически всю эту хромосому (http://www.sanger.ac.uk/cgi-bin/yeastpub/pombe_chr_status).

Гены, соседствующие с *rpb9*⁺

Мы установили первичную структуру трех протяженных участков I, II и III геномной вставки *Sz. pombe* в составе плазмиды рYUG7 (рис. 1). Помимо исходной плазмиды в этой работе были использованы ее укороченные производные – рYUG7/*KpnI* и рYUG7/*PstI*. Секвенирование осуществляли по методу Сэнгера с использованием как радиоактивной, так и флуоресцентных меток (см. “Эксперимент. часть”). Анализ установленной первичной структуры областей I, II и III (номера депонирования в GenBank соответственно: AF237420, AF237418 и AF237419) позволил выявить гены *Sz. pombe*, присутствующие в составе рYUG7.

Поиск открытых рамок считывания в нуклеотидной последовательности области II с помощью программы DNA Strider [21] и их последующее сравнение с базами данных GenBank и SwissProt с использованием программы Advanced

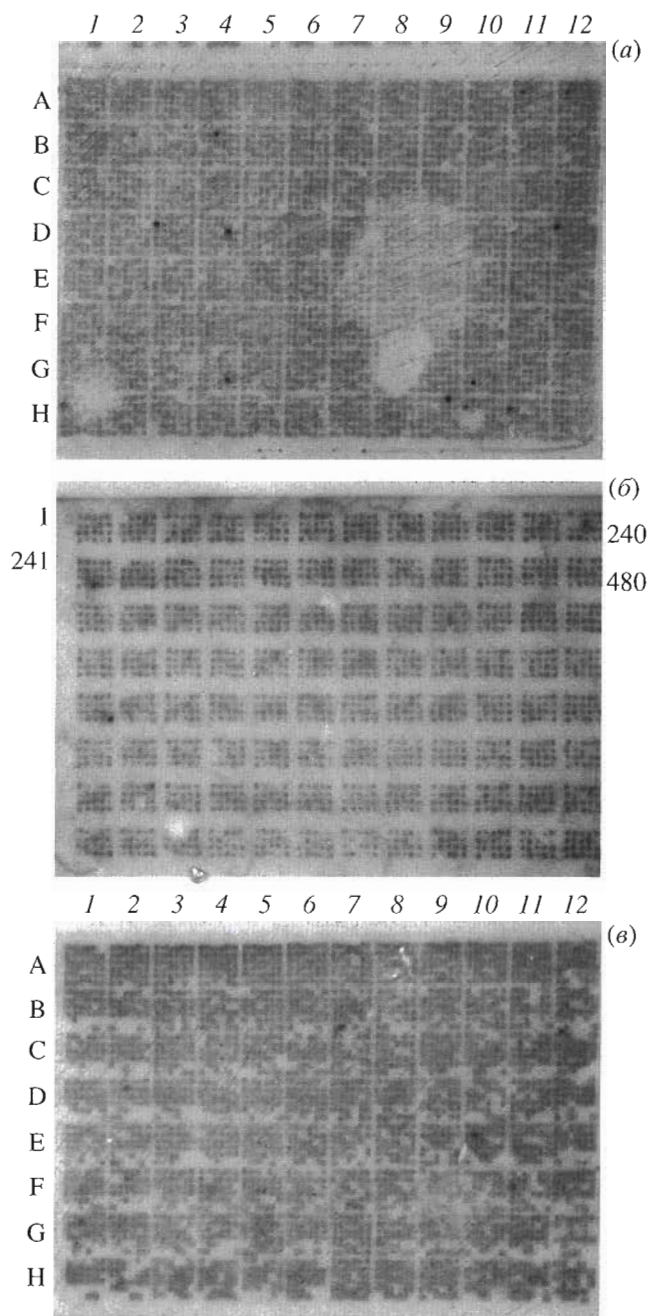


Рис. 2. Авторадиограмма результатов гибридизации космидных фильтров клонотек ICRF [17] (а), CSHL [18] (б), а также клонотек на основе бактериофага P1 [17] (в) с радиоактивно меченными *EcoRI*-фрагментами плазмиды pYUG7. Буквы А–Н и цифры 1–12 определяют координаты квадратных ячеек на фильтре, каждая из которых содержит 36 (в случае P1-клонотек или клонотек ICRF) или 20 (клонотека CSHL) космид. Положительные сигналы гибридизации видны для космид **c17D4** (космида № 17 ячейки D4), c5H9, c29G4, c7D12, c7D3; c9B4, c26G10, c7H11; c7H1, c8A11, c8A12, c10B2 и c7H10 клонотек ICRF, для космид c980 и c258 клонотек CSHL (для этой клонотек принята чисто цифровая нумерация космид – по двадцать, ячейка за ячейкой) и для космид p32B7, p8E10, p13F11 и p9D2 (библиотека в векторе на основе фага P1).

РНК-полимераза II *Schizosaccharomyces pombe*: субъединицы и их гены*

Ген	Хромосома (геномный клон)	Число интронов и их длина, п. о.	Комплементация гена-гомолога в <i>S. cerevisiae</i> [13]	Субъединица	Число а. о.	Молекулярная масса		р/ расч. (ExpASY)	Ссылка в GenBank (кДНК и ген)
						эксп., кДа [12]	расч., Да		
<i>rpb1⁺</i>	II (c28F2)	6 (35 + 40 + 39 + 45 + 92 + 47)	–	Rpb1	1752	210	194 163	5.62	X56564
<i>rpb2⁺</i>	I (c521 + c23G3)	1 (38)	–	Rpb2	1210	150	137819	6.43	D13337
<i>rpb3⁺</i>	III (c1442)	2 (43 + 46)	+ (<i>ts</i>)	Rpb3	296	41	33603	4.55	D15070
<i>rpb4⁺</i>	II (c337)	3 (38 + 45 + 74)	+	Rpb4	135	16	15362	4.84	AF149308 AL031854
<i>rpb5⁺</i>	I (c23C4)	2 (64 + 211)	+	Rpb5	210	27	23915	9.28	AF027820 D43785
<i>rpb6⁺</i>	III (pGVS43, c1020)	1 (218)	+	Rpb6	142	22	15729	4.28	L00597
<i>rpb7⁺</i>	I (pYUK71)	1 (67)	+	Rpb7	172	21	19017	5.36	AF027821 AF055916
<i>rpb8⁺</i>	II (c14C8)	2 (59 + 48)	–	Rpb8	125	16	14300	5.66	AF020780 AF029688
<i>rpb9⁺</i>	I (pYUG7)	4 (67 + 123 + 42 + 75)	+	Rpb9	113	15	13175	5.81	AB007988 AF237418
<i>rpb11⁺</i>	I (c3A12)	2 (45 + 46)	+ (<i>ts</i>)	Rpb11	123	15	14128	4.93	AF027822 Z95395
<i>rpb10⁺</i>	I (c1B3)	2 (316 + 63)	+	Rpb10	71	11	8276	7.60	X95733 AF027818
<i>rpc10⁺</i>	II (c19C2)	1 (53)	+	Rpc10	63	12	7203	9.94	U80217 AF027819

* Серым цветом выделены субъединицы, общие для ядерных РНК-полимераз I–III. Клоны и номера депонирования в GenBank, выделенные жирным шрифтом, являются результатом работы нашей группы.

Gapped BLAST 2.0 [22] показали, что слева от *rpb9⁺* находится ген *pro3⁺*, кодирующий Δ^1 -пирролин-5-карбоксилат-редуктазу (P5CR; L-пролин: NAD(P)⁺-5-оксидоредуктазу; proC; КФ 1.5.1.2), фермент, осуществляющий последнюю стадию в синтезе пролина [23, 24]. Установление полной первичной структуры *pro3⁺* в составе pYUG7 было завершено в Сэнгеровском центре (Великобритания): показано, что Δ^1 -пирролин-5-карбоксилат-редуктаза *Sz. pombe* содержит 282 а. о. и имеет 34.5% гомологии с ортологичным белком из *Saccharomyces cerevisiae* (рис. 3).

С другой стороны от *rpb9⁺* расположен гипотетический ген, способный кодировать полипептид длиной более 700 а. о. На основе обнаруженной нами гомологии, правда, весьма отдаленной, с белками Dmf1/Mid1 *Sz. pombe* (белок, необходимый для правильного расположения септы-перегородки при клеточном делении) [25], Int1 *Candi-*

da albicans (интегринподобный белок) [26] и AGA1 *S. cerevisiae* (кóровая субъединица α -агглютинина) [27] можно предположить, что белок, кодируемый обсуждаемым геном, является гликопротеидом.

Другие гены *Sz. pombe* в составе геномного клона pYUG7

Мы также структурно охарактеризовали концевые части вставки ДНК *Sz. pombe* в плазмиде pYUG7 (рис. 1). В секвенированной области I обнаружен ген, способный кодировать гипотетический белок, который, по-видимому, присутствует также у всех высших эукариот-метазоев (у *Arabidopsis thaliana*, *Caenorhabditis elegans* и *Homo sapiens* обнаружены даже соответствующие мРНК или ESTs (экспрессирующиеся последовательности), но отсутствует в протеоме *S. cerevisiae*

Sp:	1	MSGFCVLGCGTMGKALLTGIFDSIAENGNVDSEIIIPNKFYACVKFPKEKEDVQKLFG-----	59
		+LGCG MG+ALL+ I++ A D + P+K C + V L	
Sc:	1	MTYTLAILGCGVMGQALLSAIYN--APKAADETAAAFYPSKIITCNHDEPSAQQVTDLVETFDDESP	64
Sp:	60	DRVKVVMGAKENAEMAASNVLLLSCKPQAAEDVLNSPKMKEALKGKLLSILAGKTISS	119
		+ +KV N ++V+LL KP AE+VLN +K + GKL++S+ AG TI	
Sc:	65	NGIKVESTYGHNVSAVEEASVLLGTPFLAAEEVLNG--VKSIVIGGKLLISLAAGWTIDQ	122
Sp:	120	LQSMLESTRVIRIMPNTASRIRESMSVICPGPNATEEDIKFAEWFVNGIGRSMKLEPEKL	179
		L ++ V R+M NT ++ +V+ + ++E + + +G+ ++LPEK	
Sc:	123	LSQY---TSTVCRVMTNTPAKYGYGCAVVSYSADVSKEQKPLVNELISQVKGKVELPEKN	179
Sp:	180	IDAATAVCGSGPAFVATMIEAMTDGGVMMGIFPPQAQELAAQTMVGTGRMV-LQGQHPAM	238
		+DAATA+ GSGPAFV M+E++ + G+ +GIP +++E A + + GT +MV G HP++	
Sc:	180	MDAATALVGGSGPAFVLLMLESMLMESGLKLGIPLQESKECAMKVLGTVKMEKSGAHPVS	239
Sp:	239	IRNDVSTPAGCTISGLLALEDGKIRSTIARGIEQATKTASGLGK	282
		+++ V TP G TI+GL +E+ ++S I G+E+A + AS LG+	
Sc:	240	LKHQVCTPGGTTIAGLCVMEEKGVKSGIINGVEEAARVASQLGQKKK	286

Рис. 3. Сравнение аминокислотной последовательности продукта гена *pro3⁺ Sz. pombe* (Sp) с первичной структурой Δ^1 -пирролин-5-карбоксилат-редуктазы (КФ 1.5.1.2) *S. cerevisiae* [24] (Sc); здесь и ниже – программа Advanced Gapped BLAST 2.0 [22].

(рис. 4). Именно поэтому, хотя предсказать точную функцию этого гена на данный момент вряд ли возможно, он несомненно будет интересным объектом изучения у *Sz. pombe* – как (и прежде всего) в плане сравнительной геномики делящихся и почкующихся дрожжей, так и с целью выяснения его роли у многоклеточных организмов. В связи с последним интересно, что совсем недавно китайские ученые показали, что одна из форм мРНК гомолога этого гена (вероятно, продукт альтернативного сплайсинга, см. рис. 4) накапливается в клетках линии NB4 (полученных от больного с острой промиелоцитарной лейкемией) при их апоптозе (номер депонирования в GenBank AF229834). Следуя названию человеческого гена, предложенному китайской группой, мы назвали обнаруженный ген *Sz. pombe hag1⁺* (**h**omologue of **a**poptosis-related **g**ene). Как показано на рис. 4, структурное сходство проявляют только первые две трети аминокислотных последовательностей белков-гомологов из разных организмов. Множественные формы обсуждаемого белка, возможно имеющего отношение к апоптозу, присутствуют не только в клетках человека, но и у двудольного растения *Arabidopsis thaliana*, где сходные дублированные гены, по видимому, представлены на каждой из пяти хромосом.

Два гена делящихся дрожжей, *sin1⁺* и *tfal⁺*, идентифицированы нами в правой части вставки

в составе области III (рис. 1). Ген *sin1⁺* был описан ранее в работе [29], но его положение на хромосомной карте *Sz. pombe* не было установлено. По данным этой работы, Sin1 (SAPK /Stress Activated MAP Kinase/ interacting protein) оказался членом эволюционно консервативного семейства белков, участвующих у эукариот в SAPK-пути передачи сигнала при регуляции транскрипции в условиях стресса. Было показано, что Sin1 *Sz. pombe* также абсолютно необходим для инициации процессов половой дифференцировки и конъюгации [29].

На хромосоме I Sz. pombe расположен ген tfal⁺, кодирующий α -субъединицу общего фактора инициации транскрипции TFIIЕ

Другой, и самой интересной для нас находкой в области III геномного клона pYUG7 оказался впервые обнаруженный в составе генома *Sz. pombe* ген, кодирующий одну (большую, или α -) из субъединиц общего фактора транскрипции TFIIЕ [30] (52% гомологии с соответствующим белком *S. cerevisiae*). По современным представлениям, фактор TFIIЕ присоединяется к преинициаторному комплексу после факторов TFIIД, TFIIА, TFIIВ, РНК-полимеразы II и TFIIЕ, образуя стабильный комплекс с ДНК [8]. Именно TFIIЕ вовлекает в преинициаторный комплекс транскрипции другой общий фактор инициации, TFIIН, модулируя при этом его геликазную, АТФ-азную и киназную

AtII:	1	MLCFKGSVKKRKKQSGSVPVYLNVDL---TPMAYGYWLGLGVFHSQVEVHGVEYAFGAHESS-STGI	64
		MLCRKNS G+VPVYLNVDL---TP+N+Y+YWLGLGV+HSGVEVHG+EYA+GAHE STGI	
AtI:	1	MLCRKNSSLV--DRGNVPVYLNVDL---TPINGYAYWLGLGVYHSGVEVHGIEYAYGAHEYP-STGI	62
		VY+NVDL +P+N A+ LGLG+YH+G+ + G EYA+GAHE P STG+	
Sp:	1	MKVYINVDLMPDSPVNKLAWTLGLGIYHTGLVLEGKEYAFGAHEIPGSTGV	52
		V +NVD+ +N+ ++G+G+H+G+ + G+E+A+G H P S G+	
Hs (CGI-146):	1	MGANQLVVLNVYDMYW---MNEYTSSIGIGVVFHSGIEVYGREFAYGGHPYPFS-GI	52
		MGANQLVVLNVYDMYW---MNEYTSSIGIGVVFHSGIEVYGR	
Hs (PNAS-4):	1	MGANQLVVLNVYDMYW---MNEYTSSIGIGVVFHSGIEVYGR-----	38
AtII:	65	FEVEPKK-CP---GFTFRKSIILVGTDLVAKEVRFVMEKLAEEYQCNKYHLITRNCNHFCEVCLKLA	128
		FE EPK+ C GFTFRKSIIL+GKTDL EVR ME+LA+ Y+G+ Y LIT+NCNHFCE+E C+KI	
AtI:	63	FEVEPKK-CE---GFTFRKSIILGKTDLGPLEVRATMEQLADNYKSSYNLITKNCNHFCEDETCIKLT	126
		F P+ E G +R SI + L +V + +L+ + G SY+L+ +NCNHF + I+LT	
Sp:	53	EATMRPPLE---GCRWRCSIALPNCTLPKPDVDRILIRLSQEFGLSYSLLRNCNHFETNAAIETL	117
		F P E +++ ++ L + + D+++I+ L +E+ G +Y L+ +NCNHF++A + L	
Hs:	53	FEISEGNASELGETFKFKEAVVLGSTDFLEDDIEKIVEELGKEYKGNAYHLMHKNCNHFSSALSEILC	120
		AVVLGSTDFLEDDIEKIVEELGKEYKGNAYHLMHKNCNHFSSALSEILC	
Hs:	39	-----AVVLGSTDFLEDDIEKIVEELGKEYKGNAYHLMHKNCNHFSSALSEILC	87
AtII:	129	QKSI PRWVNRLARLGVLCNCVLPFR	153 .. 231
		TPSWVNRLAR+G + +	
AtI:	127	GNPIPSWVNRLARIGKFSGFMCNCV	151 .. 240
		G+PIPS++NR++RIG N	
Sp:	118	GSPIPSFLNRISRIGLAFPTITNAL	142 .. 201
		G TP ++NR++ P + L	
Hs:	121	GKEI PRWINRLAYFSSCIPFLQSC	145 .. 193
		GKEI PRWINRLAYFSSCIPFLQSC	
Hs:	88	GKEI PRWINRLAYFSSCIPFLQSC	112 .. 161

Рис. 4. Сравнение аминокислотной последовательности продукта гена *hag1⁺* *Sz. pombe* с первичной структурой гомологичных гипотетических белков, кодируемых генами на хромосомах I и II двудольного растения *Arabidopsis thaliana* (AtI и AtII [28]), а также с продуктами трансляции CGI-146 и PNAS-4 (номера депонирования в GenBank соответственно AF151904 и AF229834) двух полноразмерных мРНК человека (Hs), более короткая из которых (PNAS-4) отвечает за синтез белка, по-видимому, участвующего в процессе апоптоза культуры клеток линии NB4. Серым цветом выделены аминокислотные остатки, идентичные во всех последовательностях. Приведены только гомологичные участки первичных структур обсуждаемых белков.

активности. Не исключается также прямое участие TFIE в плавлении промоторного участка ДНК [5].

В соответствии с обозначением ортологичного гена *S. cerevisiae* [31] обнаруженный нами ген *Sz. pombe* назван *tfa1⁺* (transcription factor a). Геномная и частичная кДНК-последовательности гена *tfa2⁺*, кодирующего другую субъединицу (β -) фактора TFIE *Sz. pombe*, были ранее депонированы в EMBL/DDBJ/GenBank другими авторами соответственно под номерами AL031324 и AB000475. В настоящее время мы клонируем полноразмерную кДНК гена *tfa1⁺*, что позволит подтвердить предсказанную с помощью компьютерной обработки геномной последовательности экзон-интронную структуру этого гена (см. рис. 1 и GenBank AF237419). Хотя принципы структурной организации и функциональной регуляции генома

эукариот все еще недостаточно изучены, обнаруженная нами в данной работе близость расположения генов *rpb9⁺* и *tfa1⁺*, участвующих в инициации процесса синтеза мРНК [8, 32], может указывать на определенную координацию их экспрессии.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Приготовление бактериальных клеток, компетентных для электропорации. LB-бульон (100 мл) засекали 1 мл ночной культуры клеток *Escherichia coli* TG1 (*supE44, thi, Δ[lac, pro], hsdΔ5, strA, endA, F⁺[traD36, proAB⁺, lacZΔM15]*). Клетки выращивали при 37°C с аэрацией до ранней или средней логарифмической фазы. Биомассу охлаждали во льду 15–30 мин, центрифугировали в холодном роторе 10 мин при 2400 об/мин (центрифуга

К-80, СССР). Клетки суспендировали последовательно в 100, 50, 2 мл и в конечном объеме 300 мкл охлажденного во льду стерильного 10% глицерина, каждый раз центрифугируя при том же режиме и тщательно удаляя супернатант. Суспензию клеток расфасовывали по 50 мкл, замораживали и хранили при -70°C .

Трансформацию компетентных клеток бактерий плазмидной ДНК проводили путем электропорации на приборе Gene Pulser фирмы "Bio-Rad" (США) с использованием аппарата Pulse Controller той же фирмы для точного дозирования пульса (для точной установки параметров электрического импульса). Замороженную суспензию подготовленных для электропорации клеток (50 мкл) размораживали на ледяной бане и добавляли 1–1.5 мкл раствора ДНК в ТЕ-буфере (10 мМ Трис-НСl, рН 7.6, 1 мМ EDTA) с концентрацией 0.5 мкг/мкл. Электропорационную кювету (расстояние между электродами 2 мм) охлаждали во льду и, перенеся в нее смесь клеток для электропорации и ДНК, подвергали воздействию экспоненциально убывающего электрического поля с высоким начальным значением напряженности (параметры электротрансформации: емкость разряжаемого конденсатора 25 мкФ, сопротивление шунтирующего резистора 200 Ом, начальное значение напряжения на конденсаторе 2.5 кВ). При этом время релаксации τ составляло, как правило, 4.5–4.7 мс. После этого к клеткам сразу же добавляли 1 мл LB-бульона (1% бакто-триптон, 0.5% дрожжевой экстракт, 0.5% хлорид натрия), клетки переносили в пробирку Eppendorf и инкубировали при 37°C в течение 1 ч. Затем по 50 мкл суспензии клеток рассеивали на селективные чашки с LB-агаром (LB-бульон с 1.5% агаром).

Просеивание геномной клонотеки *Sz. pombe*, сконструированной на основе челночного вектора рНL10 [14], осуществляли с помощью ПЦР по методу последовательных разведений клонотек [15, 16] с использованием праймеров оGVS350 (5') CGGGATCCTTAAAATGTCAAATTTTC и оGVS351 (5') CCGAATTCTCGCATATTACTG, специфических для гена *rpb9⁺* (подчеркнуты участки узнавания рестриктаз *Bam*HI и *Eco*RI, введенные для удобства клонирования продуктов ПЦР). ДНК первичного разведения А7 геномной клонотеки, давшего положительный сигнал при ПЦР с приведенными выше праймерами, трансформировали с помощью электропорации в клетки *E. coli* штамма TG-1. Искомый клон рYUG7 был получен после трех раундов разведений полученного после электропорации рассева колоний (клон А7-1-7-7).

Делеционные производные клона рYUG7 (плазмиды рYUG7/KpnI и рYUG7/PstI) были полу-

чены путем расщепления ДНК рYUG7 соответствующим ферментом рестрикции, отделения малого фрагмента и последующего лигирования оставшегося большого фрагмента исходной плазмиды, содержащего всю ее векторную часть (см. рис. 1).

Приготовление радиоактивно меченного зонда. *Eco*RI-фрагменты плазмиды рYUG7, содержащие вставку ДНК *Sz. pombe* (1.0–2.8 т. п. н.), отделяли от более крупного векторного фрагмента (12.4 т. п. н.) с помощью электрофореза в 0.8% агарозном геле, выделяли по методу прямой элюции ДНК [33] и липкие *Eco*RI-концы дотраивали с помощью фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli* и [α - ^{32}P]dATP (синтезирована в изотопном блоке ИБХ РАН).

Гибридизацию на фильтрах высокой плотности всех трех космидных клонотек *Sz. pombe* (предоставлены Риан Гвильям, Сэнгеровский центр, г. Хинкстон, Великобритания) осуществляли в одинаковых условиях, основываясь на методике гибридизации в водном растворе [34]. Предгибридизацию фильтров проводили при 65°C в течение 1 ч в растворе следующего состава: 1% BSA (фракция V), 1 мМ EDTA, 0.5 М Na-фосфат, рН 7.2, 7% SDS. К смеси радиоактивно меченных зондов (~2–3 мкг) добавляли 2 мг обработанной ультразвуком ДНК сельди (*Serva*, Германия, 1 мг/мл) и кипятили 10 мин, после чего полученную пробу разбавили 2 мл упомянутого выше раствора для гибридизации. Гибридизацию проводили в течение ночи при 65°C . Фильтры дважды быстро промыли следующим раствором: 0.5% BSA, 1 мМ Na₂EDTA, 40 мМ Na-фосфат, рН 7.2, 5% SDS при комнатной температуре; для более жесткой промывки при 65°C (дважды быстро и один раз в течение 20 мин) использовали тот же раствор, но с 1% SDS. После просушки при комнатной температуре фильтры экспонировали с рентгеновской пленкой Kodak Biomax MR с усиливающим экраном в течение 1 сут.

ДНК секвенировали по методу Сэнгера [35] с использованием как радиоактивной ([α - ^{32}P]dATP, синтезирована в изотопном блоке ИБХ РАН; для секвенирования использовали прибор Macgorphor фирмы LKB, Швеция), так и флуоресцентных меток (секвенирование проводили на приборе ABI-Prism Genetic Analyzer, Model 373 фирмы Applied Biosystems (США) в Институте генетики и молекулярной и клеточной биологии (IGBMС), Страсбург, Франция). С помощью радиоактивной метки были секвенированы концевые фрагменты плазмид рYUG7, рYUG7/PstI и рYUG7/KpnI (по 400–500 нт в каждом случае).

Компьютерную обработку нуклеотидных последовательностей ДНК осуществляли с помощью программы DNA Strider [21] на компьютере

Macintosh Quadra 610 (фирма Apple, США), для их сравнения с базами данных GenBank/EMBL и SwissProt использовали пакет программ BLAST сервера <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> [22].

Установленные в данной работе геномные последовательности *Sz. pombe* из плазмиды rYUG7 депонированы в GenBank под номерами AF237418, AF237419 и AF237420.

Авторы благодарны Р.Г. Гвильям за предоставленные фильтры космидных клонотек *Sz. pombe*, А.Л. Каюшину за синтез олигонуклеотидных праймеров и Е.Н. Лебедеко за ценные замечания по тексту статьи.

Настоящая работа поддержана грантом Государственной научно-технической программы "Новейшие методы биоинженерии" (направление "Генная инженерия и транскеноз").

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Thuriaux P., Sentenac A.* // The Molecular and Cellular Biology of the Yeast *Saccharomyces*: Gene Expression / Eds J.R. Broach, J.R. Pringle, E.W. Jones. Cold Spring Harbor, N.Y.; Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1992. V. II. P. 1–48.
2. *Woychik N.A., Young R.A.* // Transcription Mechanisms and Regulation / Eds R.C. Conaway, J.W. Conaway. N.Y.: Raven Press, 1994. P. 227–242.
3. *Schaller S., Grandemange S., Shpakovski G.V., Golemis E.A., Kedinger C., Vigneron M.* // FEBS Lett. 1999. V. 461. P. 253–257.
4. *Hernandez N.* // Genes Dev. 1993. V. 7. P. 1291–1308.
5. *Roeder R.G.* // Trends Biochem. Sci. 1996. V. 21. P. 327–335.
6. *Ozer J., Moore P.A., Lieberman P.M.* // J. Biol. Chem. 2000. V. 275. P. 122–128.
7. *Ren D., Lei L., Burton Z.F.* // Mol. Cell. Biol. 1999. V. 19. P. 7377–7387.
8. *Orphanides G., Lagrange T., Reinberg D.* // Genes Dev. 1996. V. 10. P. 2657–2683.
9. *Шпаковский Г.В., Лебедеко Е.Н.* // Биоорган. химия. 1997. Т. 23. С. 988–991.
10. *Sakurai H., Kimura M., Ishihama A.* // Gene. 1998. V. 221. P. 11–16.
11. *Шпаковский Г.В., Баранова Г.М.* // Биоорган. химия. 1999. Т. 25. С. 938–942.
12. *Sakurai H., Mitsuzawa H., Kimura M., Ishihama A.* // Mol. Cell. Biol. 1999. V. 19. P. 7511–7518.
13. *Shpakovski G.V., Gadal O., Labarre-Mariotte S., Lebedenko E.N., Miklos I., Sakurai H., Proshkin S.A., van Mullem V., Ishihama A., Thuriaux P.* // J. Mol. Biol. 2000. V. 295. P. 1119–1127.
14. *Weaver D.C., Shpakovski G.V., Caputo E., Levin H.L., Boeke J.D.* // Gene. 1993. V. 131. P. 135–139.
15. *Shpakovski G.V.* // Gene. 1994. V. 147. P. 63–69.
16. *Шпаковский Г.В., Лебедеко Е.Н., Тюрью П.* // Биоорган. химия. 1997. Т. 23. С. 110–117.
17. *Hoheisel J.D., Maier E., Mott R., McCarthy L., Grigoriev A.V., Schalkwyk L.C., Nizetic D., Francis F., Lehrach H.* // Cell. 1993. V. 73. P. 109–120.
18. *Mizukami T., Chang W.I., Garkavtsev I., Kaplan N., Lombardi D., Matsumoto T., Niwa O., Kounosu A., Yanagida T., Marr T.G., Beach D.* // Cell. 1993. V. 73. P. 121–132.
19. *Шпаковский Г.В., Баранова Г.М., Вуд В., Гвильям Р.Г., Шематорова Е.К., Корольчук О.Л., Лебедеко Е.Н.* // Биоорган. химия. 1997. Т. 25. С. 450–463.
20. *Shpakovski G.V., Shematorova E.K.* // Curr. Genet. 1999. V. 36. P. 208–214.
21. *Marck C.* // Nucl. Acids Res. 1988. V. 16. P. 1829–1836.
22. *Altschul S.F., Madden T.L., Schaffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.* // Nucl. Acids Res. 1997. V. 25. P. 3389–3402.
23. *Kelly R., Register E.* // Gene. 1996. V. 172. P. 149–153.
24. *Brandriss M.C., Falvey D.A.* // J. Bacteriol. 1992. V. 174. P. 3782–3788.
25. *Sohrmann M., Fankhauser C., Brodbeck C., Simanis V.* // Genes Dev. 1996. V. 10. P. 2707–2719.
26. *Gale C., Finkel D., Tao N., Meinke M., McClellan M., Olson J., Kendrick K., Hostetter M.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996. V. 93. P. 357–361.
27. *Roy A., Lu C.F., Marykwas D.L., Lipke P.N., Kurjan J.* // Mol. Cell. Biol. 1991. V. 11. P. 4196–4206.
28. *Lin X., Kaul S., Rounsley S.D., Shea T.P., Benito M.-I. et al.* // Nature. 1999. V. 402. P. 761–768.
29. *Wilkison M.G., Pino T.S., Tournier S., Buck V., Martin H., Christiansen J., Wilkinson D., Millar J.B.A.* // EMBO J. 1999. V. 18. P. 4210–4221.
30. *Peterson M.G., Inostroza J., Maxon M.E., Flores O., Admon A., Reinberg D., Tjian R.* // Nature. 1991. V. 354. P. 369–373.
31. *Feaver W.J., Henry N.L., Bushnell D.A., Sayre M.H., Brickner J.H., Gileadi O., Kornberg R.D.* // J. Biol. Chem. 1994. V. 269. P. 27549–27553.
32. *Hull M.W., McKune K., Woychik N.A.* // Genes Dev. 1995. V. 9. P. 481–490.
33. *Hansen H., Lemke H., Bodner U.* // BioTechniques. 1993. V. 14. P. 28–30.
34. *Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A., Struhl K.* Current Protocols in Molecular Biology. Boston: John Wiley and Sons, 1995.
35. *Murphy G., Ward E.S.* // Nucleic Acids Sequencing. A Practical Approach / Eds C.J. Howe, E.S. Ward. Oxford; New York; Tokyo: IRL Press, 1989. P. 99–115.

Chromosomal Localization of the *rpb9*⁺ and *tfa1*⁺ Genes Encoding Components of the mRNA Synthesis Machinery of *Schizosaccharomyces pombe*

G. V. Shpakovskii[#] and G. M. Baranova

*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP-7 Moscow, 117871 Russia*

Using DNA hybridization on cosmid filters of high density, we established chromosomal localization of the *rpb9*⁺ gene encoding one of the specific subunits of RNA polymerase II of *Schizosaccharomyces pombe* and thus filled in the last gap in the mapping of the genes encoding components of RNA polymerase II of the fission yeast. The primary structure of three extended regions of the *Sz. pombe* chromosome I was elucidated and, as a result, genes neighboring on *rpb9*⁺ were identified. One of them proved to be the *tfa1*⁺ gene, encoding the large (α) subunit of the general factor of transcription initiation TFIIE.

Key words: fission yeast; chromosome I; rpb9⁺, tfa1⁺, pro3⁺, hag1⁺, and sin1⁺ genes; subunit Rpb9; RNA polymerase II; general transcription factor TFIIE

[#] To whom correspondence should be addressed; phone: +7 (095) 330-6583; fax: +7 (095) 335-7103;
e-mail: gvs@ibch.ru.

For the full text of English translation of this article, see *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2000, vol. 26, no. 8. It is also available (free) in PDF format through the Web Site <http://www.maik.rssi.ru/>.