



УДК 547.963.32.02

ПОДХОД К УСТАНОВЛЕНИЮ ПЕРВИЧНОЙ СТРУКТУРЫ ДНК
ФАГА Т7 В ОБЛАСТИ ГЕНА 1*Грачев М. А., Зайчиков Е. Ф., Максимова Т. Г.,
Плетнев А. Г.**Новосибирский институт органической химии Сибирского отделения
Академии наук СССР, Новосибирск*

Ген 1 фага Т7 кодирует фаговую РНК-полимеразу — белок, состоящий из одной полипептидной цепи с $M \sim 100\,000$ [1]. Установление первичной структуры этого белка позволило бы получить цепную информацию об организации активных центров матричного биосинтеза с привлечением методов аффинной модификации, которые уже были испытаны на РНК-полимеразе *E. coli* [2, 3].

Методы быстрой расшифровки ДНК принципиально дают возможность установить нуклеотидную последовательность гена 1 и тем самым найти аминокислотную последовательность Т7 РНК-полимеразы. В настоящем сообщении описан подход к расшифровке структуры гена 1, основанный на новом методе [4] рестрикционного картирования. Все сильные промоторы для РНК-полимеразы *E. coli* на ДНК фага Т7 сосредоточены вблизи ее левого конца [5]. Это дает возможность выделить из реакционной смеси неполного гидролиза рестриктазой набор продуктов разной длины, имеющих общий левый конец молекулы ДНК, отделяя их от остальных продуктов фильтрованием через нитроцеллюлозный фильтр в присутствии РНК-полимеразы *E. coli* по [6] (рис. 1а).

ДНК фага Т7 (100 мкг/мл) в буфере А (25 мМ трис-НСl, рН 7,9—50 мМ NaCl — 10 мМ MgCl₂ — 0,5 мМ дитиотреит) подвергали неполному гидролизу нуклеазой *Bsp* I [7] (30 ед. акт./мг ДНК, 2 ч при 37°С). Затем добавляли РНК-полимеразу *E. coli* [8] (3 моль/моль ДНК), через 10 мин разбавляли буфером А в 5 раз и фильтровали через нитроцеллюлозные фильтры. ДНК с фильтров элюировали как описано в [4] и подвергали гель-электрофорезу на трубках с 0,8% агарозным гелем (рис. 1б). Фрагменты элюировали из геля электроэлюцией, очищали хроматографией на оксиапатите и подвергали исчерпывающему гидролизу *Bsp* I. Сопоставляя картины разделения продуктов гидролиза каждого из фрагментов I—IX с картиной разделения гидролизата целой ДНК (рис. 1в) и данными работы [9], строили карту сайтов рестрикции *Bsp* I в области ранних генов (рис. 1г).

Для расшифровки последовательностей брали фрагменты полного гидролизата Т7 ДНК, относящиеся к гену 1 по данным карты (рис. 1г). Концевую метку вводили с помощью [γ ³²-P]АТР (3000 Ки/ммоль, Amersham, Англия) и разделяли цепи по [10]. Неполную химическую деградацию по пиримидиновым звеньям проводили как описано в [10], по пуриновым

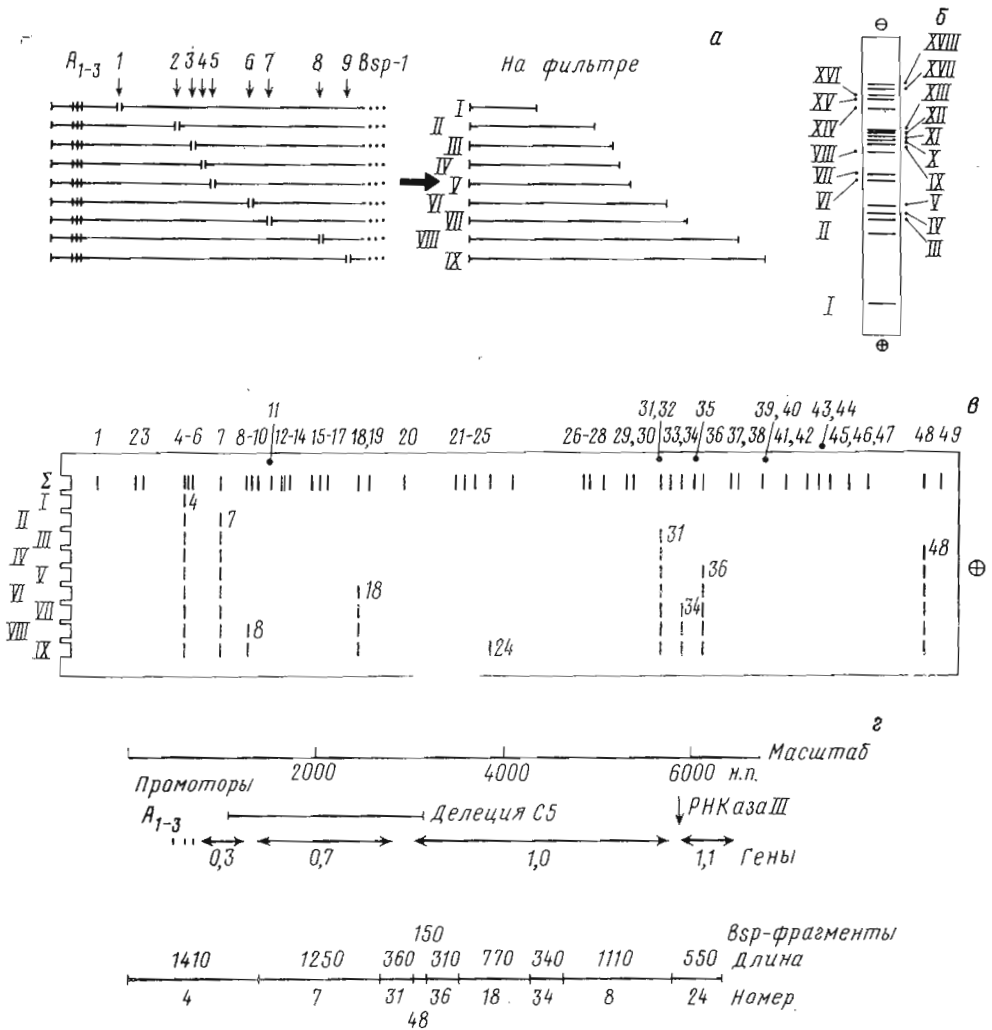


Рис. 1. Схема метода рестриционного картирования гена 1 ДНК фага Т7. а — схема метода выделения продуктов неполного *Vsp*-гидролиза, содержащих левый конец ДНК; б — геле-электрофореграмма выделенных продуктов в 0,8% агарозном геле; в — геле-электрофореграмма исчерпывающего *Vsp*-гидролизата Т7 ДНК (Σ) и исчерпывающих *Vsp*-гидролизатов фрагментов I-IX, элионированных из агарозного геля (б); геле-электрофорез проводился в 4% полиакриламидном геле; обозначения фрагментов полного *Vsp*-гидролизата даны по [9]; г — рестриционная карта, построенная по данным картины (в); длины *Vsp*-фрагментов даны по [9]; ссылки на элементы генетической карты даны в тексте

звеньям — по работам [11, 12]; алкилирование гуанозиновых звеньев проводили в слабокислой среде по методу [13]. Разделение продуктов неполной деградации по G, по (A+G), по C и по (C+T) проводили на пластинках (0,03×30×100 см) с 8% полиакриламидным гелем при 3500 В аналогично [10].

Расшифрованные последовательности показаны на рис. 2. Ориентация последовательностей фрагментов 48 и 36 относительно генетической карты была определена анализом первичной структуры этих фрагментов, содержащих 5'-концевую метку только в нижней цепи. Такие фрагменты выделяли из исчерпывающего гидролизата фрагментов IV и V (рис. 1б), меченных по обеим цепям. При полученной таким способом ориентации, изображенной на рис. 2, в одной из рамок последовательности не содержат

```

5' . . . TACGATTTACTAACTGGAAGAGCCACTAAATGAACACGATTAACATCGCTAAGAA
Bsp-48 3' . . . ATGCTAAATGATTGACCTTCTCCGTGATTTACTTGTGCTAATGTAGCGATTCTT
CGACTTCTGTGACATCGAACTGGCTGCTATCCGCTCAACACTCTGCCGTGACCATF
GCTGAAGAGCCTGTAGCTTGACCGACGATAGGGCAAGTGTGTGAGACCGACTGGTAA
ACGGTGAACGTTTGGCTCGCGG. . . 3'
TGCCACTTGCAAACCGAGCGCC. . . 5'

5' CGGCCTGCGCTCAAATGGATTGACATGAAGAACC AAGAGCCCCATGAAGAGTCCC
Bsp-36 3' GCGCGGACGCGAGGTTTACCTAATCTGACTCTCTTGGTTCTCGGGGTACTTCTCAGGG
TCGTTGAACCAATCCGTAAGAAAGATAAAGCTCTCTTTAAGCTGCACACCGGATA
AGCAACTTG GTTAGGCATCTTTCTATTTTCGAGGAAAATTCGACGTGTGGCSTAT
CCTTACATAAAACTGTACGCTATCCCTCCGCTGCACATCGTGGAGTCTGGAGAA
GGAAGTGTATTTTGACATGCGATAGGAGGGCGACGTGTAGCACCTCA GACCTCTT
GACTGTGATGTGCATGACGTTGTCTCATGCAGGAACACGTTAAGAACATGCTGCCTC
CTGACACTACAGTACTGCAACGAGTACGTCCCTGTGCAATTTCTGTACGACGGAG
TGCTACAGGAATACCTTCCCTGAAATCGAATGCCAGCGGGCTGGATCTACGAGGTC
ACGATGTCTCTATGAAGGGACTTTAGCTTACCCTCGCGGACCTAGAA TGCTCCAG
TACGATA TGGTACAAC TACAGCACTGTGCGAGCGGAAGCGAACAGGAGG 3'
ATGCTATACCA TCTGTAGTCTGTTGACACGCTCGCCTTCGCTTGTCTCTCC 5'

5' . . . CACAACGTGGACTGGCGCGGTCGTGTTTACGCCGTGTCAATGTTCAACCCGCAAG
Bsp-34 3' GTAACGATATGACCAAAGGACCGCCATGCCGG CGAAAGGTAAGCCAGTCCGTAAGGCA
AGGACCGACCACC. . . 3'

5' . . . CCCAGCGTACTCAAAGCAGAACGCAAGGAAGCAGAACGGAGAATCTTGCTCAGCCCACC
AAGTGTCTTCCAGTGGAGACTTGACGCAAGCATGATG. . . 3'

```

Рис. 2. Первичные структуры фрагментов, установленные в настоящей работе

терминаторов белкового синтеза. Ориентация расшифрованных частей фрагмента 34 пока не установлена. Введение метки во фрагмент III позволило установить структуру его правой части на длине около 50 н.п., которая полностью совпадает с известной (Д. Мак-Коннелль, неопубликованные данные). Анализ фрагмента 24 также полностью подтвердил известную структуру его левой части [14], содержащей сайт РНКазы III, разделяющий гены 1 и 1,1. По данным работ [15, 16], сайт РНКазы III, разделяющий гены 0,7 и 1, должен располагаться в нерасшифрованной пока части фрагмента 31. Поскольку делеция С5, затрагивающая фрагмент 48 [9], повреждает мРНК гена 1 и снижает эффективность инициации его синтеза, но не изменяет длину Т7 РНК-полимеразы и не сказывается на его функции [15], можно предполагать, что начало белка приходится на фрагмент 48 или 36. Можно надеяться, что изложенный здесь подход позволит в ближайшее время установить полную структуру гена 1.

Авторы приносят благодарность А. И. Сметаниной за отличную техническую помощь, М. И. Церельройзену за машинную обработку данных, В. Г. Коробко и В. А. Каргинову за помощь в овладении модифицированными методами расшифровки последовательностей ДНК и Е. Д. Свердлову за интерес к работе и обсуждение результатов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Chamberlin M., McGrath J., Waskell L. (1970) *Nature*, **228**, 227-231.
2. Свердлов Е. Д., Царев С. А., Модянов Н. Н., Липкин В. М., Грачев М. А., Зайчиков Е. Ф., Плетнев А. Г. (1978) *Биоорганическая химия*, **4**, 1278-1281.
3. Sverdlov E. D., Tsarev S. A., Levitan T. L., Lipkin V. M., Modyanov N. N., Grachev M. A., Zaychikov E. F., Pletnev A. G., Ovchinnikov Yu. A. (1978) *Macromolecules in the Functioning Cell* (Salvatore F., Marino G., Volpe P., eds), pp. 149-158, Plenum Press, N. Y.-London.
4. Грачев М. А., Зайчиков Е. Ф., Кравченко В. В., Плетнев А. Г. (1978) *Докл. АН СССР*, **239**, 475-478.
5. Simon M. N., Studier F. W. (1973) *J. Mol. Biol.*, **79**, 249-266.
6. Hinkle D. C., Chamberlin M. J. (1972) *J. Mol. Biol.*, **70**, 155-186.
7. Koncz C., Kiss A., Venetianer P. (1978) *Eur. J. Biochem.*, **89**, 523-529.
8. Burgess R. R., Jendrisak J. J. (1975) *Biochemistry*, **14**, 4634-4638.
9. Gordon R., Humphries R., McConnell D. J. (1978) *Mol. Gen. Genet.*, **162**, 329-339.
10. Maxam A. M., Gilbert W. (1977) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **74**, 560-564.

- 11 Sverdlov E. D., Monastyrskaya G. S., Chestukin A. V., Budowsky E. I. (1973) FEBS Lett., **33**, 15-17.
- 12 Коробко В. Г., Грачев С. А. (1977) Биоорган. химия, **3**, 1420-1422.
- 13 Коробко В. Г., Грачев С. А., Колосов М. Н. (1978) Биоорган. химия, **4**, 1281-1283.
- 14 Oakley J. L., Strothkamp R. E., Sarris A. N., Coleman J. E. (1979) Biochemistry, **18**, 528-537.
- 15 Studier F. W. (1973) J. Mol. Biol., **79**, 237-248.
- 16 Robertson H. D., Dickson E., Dunn J. J. (1977) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **74**, 822-826.

Поступило в редакцию
16.VII.1979

AN APPROACH TO SEQUENCING T7 DNA IN THE REGION OF GENE 1

GRACHEV M. A., ZAYCHIKOV E. F., MAKSIMOVA T. G., PLETNEV A. G.

*Novosibirsk Institute of Organic Chemistry, Siberian Branch of the Academy
of Sciences of the USSR, Novosibirsk*

A map of restriction sites for *BspI* has been obtained for the region of gene 1 of DNA of T7 phage. Mapping was based on selective isolation of the products of uncomplete restrictolysis which have the intact left-hand terminus of T7 DNA by means of filtration through nitrocellulose filters in the presence of RNA-polymerase of *E. coli*. The sequence of the *BspI* fragments (nomenclature of Gordon et al.) is the following: 4, 7, 31, 48, 36, 18, 34, 8, 24. Sequencing was performed for fragments 48, 36, 34. Partial sequences of the termini of fragments 31 and 24 are identical to those found by other workers.

Технический редактор *Е. С. Кузьмишкина*

Сдано в набор 20.07.79	Подписано к печати 31.08.79.	Т-13652	Формат бумаги 70×108 ¹ / ₁₆ .	
Высокая печать	Усл. печ. л. 14,0	Уч.-изд. л. 14,1	Бум. л. 5,0	Тираж 870 экз. Зак. 2080

Издательство «Наука». 103717, ГСП, Москва, К-62, Подсосеинский пер., 21
2-я типография издательства «Наука». 121099, Москва, Шубинский пер., 10